

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-507883

(P2002-507883A)

(43) 公表日 平成14年3月12日 (2002.3.12)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード [*] (参考) |
|----------------------------------|-------|----------------|-------------------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 0 7 C 205/36 | |
| C 0 7 C 205/36 | | 205/56 | |
| 205/56 | | C 0 7 F 9/24 | F |
| C 0 7 F 9/24 | | C 1 2 Q 1/68 | |
| C 1 2 Q 1/68 | | G 0 1 N 33/15 | Z |
| 審査請求 有 予備審査請求 有 (全 619 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願平10-521832
 (86) (22) 出願日 平成9年11月6日 (1997.11.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成11年4月30日 (1999.4.30)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 2 0 4 4 4
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 2 0 1 6 6
 (87) 国際公開日 平成10年5月14日 (1998.5.14)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 7 4 4 , 4 8 1
 (32) 優先日 平成8年11月6日 (1996.11.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 7 4 4 , 5 9 0
 (32) 優先日 平成8年11月6日 (1996.11.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 シークエノム・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92121、
 サン・ディエゴ、ソレント・バリー・ロー
 ド・11555
 (72) 発明者 ケスター、フーベルト
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、
 ラ・ホーラ、ピア・マジヨルカ・ドライ
 ブ・8636・シー
 (72) 発明者 リトル、ダニエル・ビー
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・
 02110、ボストン、イースト・インディ
 ア・ロー・65
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マススペクトロメトリーに基づくDNA診断法

(57) 【要約】

生物試料中の特定核酸配列を検出するための迅速で高精度のマススペクトロメトリーに基づく方法を提供する。
 検出しようとする配列に応じて、本方法は例えば遺伝病
 もしくは染色体異数、疾病もしくは症状の予後、病原生
 物による感染を診断するため、又は同一性もしくは遺伝
 を判定するために使用できる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. ターゲット核酸分子の配列の決定方法であって、
 - a) ターゲット核酸から少なくとも2個の核酸フラグメントを生成する段階と、
 - b) 少なくとも2個のフラグメントをマスマスベクトロメトリーフォーマットにより分析し、ターゲット核酸分子の配列を決定する段階を含む前記方法。
2. 段階a)においてエンドヌクレアーゼをターゲット核酸と接触させ、少なくとも2個の核酸フラグメントを生成する請求項1に記載の方法。
3. エンドヌクレアーゼがターゲット核酸中の少なくとも1個の制限部位を認識し、これを開裂することが可能な制限酵素である請求項2に記載の方法。
4. ターゲット核酸がデオキシリボ核酸であり、ヌクレアーゼがデオキシリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。
5. ターゲット核酸がリボ核酸であり、ヌクレアーゼがリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。
6. リボヌクレアーゼがG特異的T₁リボヌクレアーゼ、A特異的U₂リボヌクレアーゼ、A/U特異的P₁hyMリボヌクレアーゼ、U/C特異的リボヌクレアーゼA、C特異的ニフトリ肝リボヌクレアーゼ及びクリサピチンから構成される群から選択される請求項5に記載の方法。
7. 段階a)において増幅と特定塩基ターミネーション反応の併用実施により核酸フラグメントを生成する請求項1に記載の方法。
8. 増幅と特定塩基ターミネーション反応の併用が、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもつ第1のポリメラーゼと、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ第2のポリメラーゼを使用して実施される請求項7に記載の方法。
9. 第1及び第2のポリメラーゼが熱安定DNAポリメラーゼである請求項8に記載の方法。
10. 熱安定DNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼ、AmpliTaq FS DNAポリメラーゼ、Deep Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、
20. 段階b)の前に、ターゲット核酸を含む第1の増幅産物の少なくとも一部を増幅することが可能な第2組のプライマーを使用し、第1の増幅産物で第2回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施する請求項19に記載の方法。
21. 段階b)の前にターゲット核酸を固体支持体に固定化する請求項19又は20に記載の方法。
22. ターゲット核酸を可逆的に固定化する請求項21に記載の方法。
23. ターゲット核酸が化学的、酵素的又は物理的方法により固体支持体から開裂可能である請求項22に記載の方法。
24. 光開裂性結合により固定化を行う請求項23に記載の方法。
25. ターゲット核酸を段階b)中に支持体から開裂する請求項22に記載の方法。
26. 固体支持体がビーズ、平坦表面、チップ、キャピラリー、ピン、コーム及びウェーハから構成される群から選択される請求項21に記載の方法。
27. 固体支持体に固定化した相補的捕獲核酸分子と、ターゲット核酸配列と異なる核酸分子の一部のハイブリダイゼーションにより固定化を行う請求項21に記載の方法。
28. 段階b)の前にターゲット核酸を精製する請求項19又は20に記載の方法。
29. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物を条件付けする請求項19又は20に記載の方法。
30. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物をホスホジエステル主鎖修飾により条件付けする請求項29に記載の方法。
31. ホスホジエステル主鎖修飾がカチオン交換である請求項30に記載の方法。
32. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物をアルキル化剤又は塩化トリアルキルシリルとの接触により条件付けする請求項29に記載の方法。
33. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物の脱プリン感度を低下させる

ラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメ

ラーゼ、Deep Vent DNAポリメラーゼ、Thermo Sequenase, exo (-) Pseudococcus furiosus (Pfu) DNAポリメラーゼ、AmpliTaq, Ultman, 9 degree Nm, Tth, Hot Tub, Pyrococcus furiosus (Pfu) 及び Pyrococcus woesei (Pwo) DNAポリメラーゼから構成される群から選択される請求項9に記載の方法。

11. 段階a)で生成される少なくとも2個の核酸フラグメントが質量変異ヌクレオチドを含む請求項1に記載の方法。
12. 少なくとも2個のフラグメントが3' タグを含む請求項1に記載の方法。
13. 少なくとも2個のフラグメントが5' タグを含む請求項1に記載の方法。
14. タグが非天然タグである請求項12又は13に記載の方法。
15. 非天然タグがアフィニティタグ及び質量マーカーから構成される群から選択される請求項14に記載の方法。
16. アフィニティタグが核酸の固体支持体固定化を助長する

請求項15に記載の方法。

17. アフィニティタグがビオチン又は固体支持体に結合した捕獲核酸配列に結合することが可能な核酸配列である請求項16に記載の方法。
18. 少なくとも2個の核酸フラグメントを並べてターゲット核酸の配列を決定する段階を更に含む請求項1に記載の方法。
19. 生物試料中に存在するターゲット核酸の検出方法であって、
 - a) ターゲット核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマーを使用し、生物試料から得られた核酸で第1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、第1の増幅産物を生成する段階と、
 - b) 第1の増幅産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、ターゲット核酸が検出された場合には生物試料中にターゲット核酸が存在すると判断する段階を含む前記方法。

少なくとも1種のヌクレオチドを加えることにより条件付けを行う請求項29に記載の方法。

34. ヌクレオチドがN7もしくはN9-デアザプリンヌクレオチド又は2'-フルオロ-2'-デオキシヌクレオチドである請求項33に記載の方法。
35. 組織又は細胞試料中の新形成/悪性の検出方法であって、テロメラーゼをコードするか又は癌遺伝子の突然変異に特異的であるか又は癌特異性遺伝子をコードする核酸をマスマスベクトロメトリーにより検出することにより試料中のテロメラーゼ活性、癌遺伝子の突然変異、癌特異性遺伝子の発現を検

出することと特徴とする前記方法。

36. 組織又は細胞試料中の新形成/悪性の検出方法であって、
 - a) 試料からテロメラーゼを単離し、合成DNAのテロメラーゼ特異的伸長を生じる条件下で、場合により固定化したテロメラーゼ反復に相補的な合成DNAプライマーと全4種のデオキシヌクレオチド三リン酸を加える段階と、
 - b) テロメラーゼ伸長DNA産物を増幅する段階と、
 - c) DNA産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、テロメラーゼ特異的伸長が検出された場合には新形成/悪性と判断する段階を含む請求項35に記載の方法。
37. プライマーが支持体に固定化するためのリンカー部分を含み、リンカー部分を固体支持体に結合することにより増幅プライマーを単離する請求項36に記載の方法。
38. 形質転換細胞又は組織の同定方法であって、
 - a) 1個のプライマーが固定化のためのリンカー部分を含むようにして細胞又は組織試料中で形質転換を表すコドンを含む癌遺伝子の一部を増幅する段階と、
 - c) 場合によりアレーの形態で固体支持体にリンカー部分を介してDNAを固定化する段階と、
 - d) コドンの上流の癌遺伝子配列に相補的なプライマーをハイブリダイズする段階と、

e) 3 d N T P / 1 d d N T P と DNA ポリメラーゼを加え、ハイブリダイズしたプライマーを次の d d N T P ロケーションまで伸長する段階と、

f) 試料をイオン化／揮発させる段階と、

g) 伸長した DNA の質量を検出し、質量によって野生型対立遺伝子が存在するか又は突然変異対立遺伝子が存在するかを判断し、コドンに突然変異対立遺伝子が存在する場合には新形成であると診断する段階を含む請求項 35 に記載の方法。

39. 癌遺伝子が R E T 癌遺伝子である請求項 38 に記載の方法。

40. 腫瘍特異的遺伝子の発現の検出方法であって、

a) ポリ A RNA を試料から単離する段階と、

c) 逆転写を使用して c D N A ライブラリーを調製する段階と、

d) 1 個のオリゴプライマーがリンカー部分を含むようにして腫瘍特異的遺伝子の c D N A 産物又はその一部を増幅する段階と、

e) リンカー部分を介して DNA を固体支持体に固定化するこ

とにより増幅産物を単離する段階と、

f) 場合により DNA を条件付けする段階と、

g) 試料をイオン化／揮発させ、遺伝子の発現を表す DNA ピークの存在を検出する段階を含む請求項 35 に記載の方法。

41. 細胞が骨髄細胞であり、遺伝子がチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子であり、遺伝子の発現が神経芽細胞腫を表す請求項 40 に記載の方法。

42. マトリックス助剤レーザーデソープション／イオン化 (MALDI) 一飛行時間 (TOF) マススペクトロメトリーを使用する 2 本鎖核酸の直接検出方法であって、

a) 細胞又は組織試料から 2 本鎖 DNA フラグメントを単離する段階と、

b) d s D N A : s s D N A 比を増加する条件として、低温 (即ち 4℃) で分析用試料を調製することと、マトリックス中で高い DNA 濃度を使用してデュプレックス形成を誘導することのうちの 1 つ又は全部を含む条件下で分析用 2 本鎖 DNA を調製する段階と、

g) 伸長した 2 本鎖ステムループ DNA を前記唯一の制限エンドヌクレアーゼで開裂し、開裂したステムループ DNA を除去する段階と、

i) 伸長産物をイオン化／揮発させる段階と、

j) 伸長したターゲット核酸の存在を検出し、野生型と質量の異なる DNA フラグメントが存在する場合にはターゲットコドンに突然変異が存在すると判断する段階を含む前記方法。

47. RNA 増幅を使用して生物試料中のターゲット核酸を検出する方法であって、ターゲット配列に相補的な領域とプロモーターをコードする領域を含むプライマーを使用してターゲット核酸を増幅する段階と、プロモーターを認識する RNA ポリメラーゼを使用して RNA を合成する段階と、マススペクトロメトリーを使用して得られた RNA を検出する段階を含む前記方法。

48. 配列番号 1~22、24、27~38、41~86、89、92、95、98、101~110、112~123、126、128 及び 129 に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの全塩基又は少なくとも約 20、好ましくは約 16 個の塩基を含み、プライマーが標識されていないマススペクトロメトリー分析用プライマー。

49. 質量改変部分を更に含む請求項 48 に記載のプライマー。

50. 生物試料中に存在するターゲット核酸配列の検出方法であって、

a) 生物試料からターゲット核酸配列を含む核酸分子を得る段階と、

b) マススペクトロメトリーを使用して検出するに十分な密度

でターゲットが存在するように、チオール結合を介してターゲット配列を支持体に固定化する段階と、

c) デテクターオリゴヌクレオチドをターゲット核酸配列とハイブリダイズする段階と、

d) ハイブリダイズしなかったデテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階と、

e) 段階 c) の産物をイオン化及び揮発させる段階と、

c) 低いイオン加速電圧を使用して段階 b) の試料をイオン化／揮発させる段階と、

d) 2 本鎖 DNA の存在を検出する段階を含む前記方法。

43. 血縁関係を認識又は突然変異を検出するための DNA 試料の比較方法であって、

a) 複数の生物試料を得る段階と、

b) 2 個以上のマイクロサテライト DNA 反復配列を含む各試料からの DNA 領域を増幅する段階と、

c) 増幅した DNA をイオン化／揮発させる段階と、

d) 増幅した DNA の存在を検出し、増幅した DNA の分子量を比較し、分子量が異なる場合には試料間に不一致が存在すると判断する段階を含む前記方法。

44. 不一致が 1 個の試料中の DNA における突然変異の存在、試料を採取した個体間の非血縁関係又は H L A 不適合性を要す請求項 43 に記載の方法。

45. 複数のマーカーを同時に試験する請求項 43 又は 44 に記載の方法。

46. 試料中のターゲット核酸の検出方法であって、

a) (i) ターゲットコドンのすぐ下流のターゲット DNA の一部に一致する 5' 末端と、唯一の制限エンドヌクレアーゼ部位を導入する配列と、自己相補的な 3' 末端をもつ第 1 のブラ

イマーと、

(ii) タグを含む第 2 の下流プライマーを使用してターゲット核酸配列を増幅する段階と、

b) リンカー部分を介して 2 本鎖増幅 DNA を固体支持体に固定化する段階と、

c) 固定化 DNA を変性させ、非固定化 DNA 鎖を単離する段階と、

d) 3' 末端をポリメラーゼにより伸長できるように、単離した非固定化 DNA 鎖の 3' 末端の内部相補的配列をアニールする段階と、

f) DNA ポリメラーゼ、3 d N T P / 1 d d N T P を加えてアニールした DNA を伸長する段階と、

f) デテクターオリゴヌクレオチドをマススペクトロメトリーにより検出し、デテクターオリゴヌクレオチドが検出される場合には生物試料中にターゲット核酸配列が存在すると判断する段階を含む前記方法。

51. ターゲット核酸分子を固定化前に増幅する請求項 50 に記載の方法。

52. デテクターオリゴヌクレオチド又はターゲット核酸配列の少なくとも一方を条件付けしておく請求項 50 又は 52 に記載の方法。

53. 固体支持体がビーズ、平坦表面、ピン及びコームから構成される群から選択される請求項 50 から 52 のいずれか一項に記載の方法。

54. ターゲット核酸をアレーの形態で固定化する請求項 50 から 53 のいずれか一項に記載の方法。

55. 支持体がシリコンウェハーである請求項 50 から 54 のいずれか一項に記載の方法。

56. クローニング、転写、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR) 及び鎖置換増幅 (SDA) から構成される群から選択される増幅法によりターゲット核酸分子を増幅する請求項 51 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

57. マススペクトロメーターがマトリックス助剤レーザーデソープション／イオン化飛行時間 (MALDI-TOF)、エレクトロスプレー (ES)、イオンサイクロトロン共鳴 (ICR) 及びフーリエ変換から構成される群から選択される請求項 50 から 56 のいずれか一項に記載の方法。

58. 少なくとも 2 種のデテクターオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド模倣体に質量差をつけることにより試料を条件付けて、少なくとも 2 種のターゲット核酸配列を同時に検出及び区別する請求項 50 から 57 のいずれか一項に記載の方法。

59. 少なくとも 2 種のオリゴヌクレオチドの長さ又は配列の

相違により質量差をつける請求項 58 に記載の方法。

60. デテクターオリゴヌクレオチドの塩基、糖又はリン酸部分に質量改変官能

基を導入することにより質量差をつける請求項1に記載の方法。

61. ホスホジエステル結合におけるカチオン交換により質量差をつける請求項58に記載の方法。

62. マススペクトロメトリ検出前に質量変改ジデオキシヌクレオシド三リン酸とDNA依存性DNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をDNAに増幅する請求項50から61のいずれか一項に記載の方法。

63. マススペクトロメトリ検出前に質量変改リボヌクレオシド三リン酸とDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をRNAに増幅する請求項50から62のいずれか一項に記載の方法。

64. ターゲット核酸配列が遺伝病、染色体異常、遺伝素因、ウイルス感染、真菌感染及び細菌感染から構成される群から選択される疾患又は症状を表す請求項50から63のいずれか一項に記載の方法。

65. 核酸の配列の決定方法であって、

(i) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、

(i i) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、個々のヌクレオチドを逐次遊離させる段階と、

(i i i) 逐次遊離したヌクレオチドの各々をマススペクトロメトリにより同定する段階と、

(i v) 同定したヌクレオチドから核酸の配列を決定する段階を含み、少なくとも1個の硫黄原子を介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法。

66. 核酸の配列の決定方法であって、

(i) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、

(i i) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、複数の組の入れ子核酸フラグメントを生成する段階と、

(i i i) 核酸フラグメントの組の各々の分子量をマススペクトロメトリにより測定する段階と、

(i v) 核酸フラグメントの組の分子量から核酸の配列を決定する段階を含み、

75. 質量変改ヌクレオチドがエキソヌクレアーゼ活性の程度を変更する請求項74に記載の方法。

76. 逐次遊離されるヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ遊離後でマススペクトロメトリ同定の前に質量変改する請求項74に記載の方法。

77. 逐次遊離されるヌクレオチドをアルカリホスファターゼと接触させて質量変改する請求項76に記載の方法。

78. マススペクトロメトリフォーマットがマトリックス助レーザーデソンプション(MALDI)マススペクトロメトリ又はエレクトロスプレー(ES)マススペクトロメトリである請求項65から77のいずれか一項に記載の方法。

79. 支持体の表面を3-アミノプロピルトリエタキシランの溶液と反応させ、支持体の表面に第1級アミンの均質層を生成する段階と、第1級アミンの均質層をN-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(STAB)の溶液と反応させることにより支持体の表面にヨードアセトアミド官能基を付ける段階を含む方法により固定化を実施する請求項65から79のいずれか一項に記載の方法。

80. 配列番号1~22、24、27~38、41~86、89、92、95、98、101~110、112~123、126、128及び129に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。

81. 標識されておらず、場合により、好ましくは5'末端に付けた質量変改部分を含む請求項80に記載のプライマー。

82. 選択的に開裂可能なリンカーを介して核酸を固体支持体

に固定化する請求項1から79のいずれか一項に記載の方法。

83. リンカーが熱開裂性、酵素開裂性、光開裂性又は化学開裂性である請求項82に記載の方法。

82. リンカーがトリチルリンカーである請求項82に記載の方法。

少なくとも1個の硫黄原子を介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法。

67. 核酸を少なくとも20fmol/mm²の密度で支持体の表面に共有結合する請求項65又は66に記載の方法。

68. 共有結合が形成されるような条件下でチオール反応性基を含む核酸とチオール含有不溶性支持体を反応させ、不溶性支持体に核酸を固定化する方法により固定化を実施する請求項50から67のいずれか一項に記載の方法。

69. 不溶性支持体をチオール含有試薬で修飾し、チオール含有不溶性支持体を形成する段階を更に含む請求項68に記載の方法。

70. チオール反応性架橋剤がN-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)である請求項68又は69に記載の方法。

71. 核酸が2'-デオキシリボ核酸(DNA)である請求項65又は66に記載の方法。

72. 核酸がリボ核酸(RNA)である請求項65又は66に記載の方法。

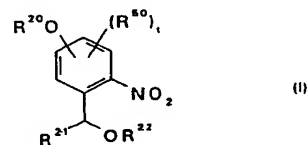
73. エキソヌクレアーゼがヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、Bai-31ヌクレアーゼ、大腸菌エキソヌクレアーゼI、大腸菌エキソヌクレアーゼVII、マ

ングマヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼ1のエキソヌクレアーゼ活性、DNAポリメラーゼ1のKlenowフラグメントのエキソヌクレアーゼ活性、T4DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、T7DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、TaqDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、DEEPVENTDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、大腸菌エキソヌタラーゼIII、λエキソヌクレアーゼ及びVENTrDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性から構成される群から選択される請求項65から71のいずれか一項に記載の方法。

74. 核酸が質量変改ヌクレオチドを含む請求項65から74のいずれか一項に記載の方法。

83. リンカーが1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)-1-オ-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンと1-(4-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-オ-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンから構成される群から選択される請求項82に記載の方法。

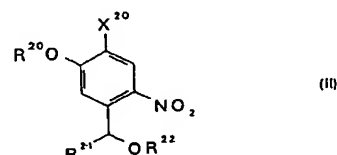
84. 式I:



【式中、R²⁰はω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル及びω-ヒドロキシアルキルから構成される群から選

択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコシカルボニル、アリールオキシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び(ジアルキルアミノ)(ω-シアノアルコキシ)P-から構成される群から選択され、tは0~3であり、R⁵⁰はアルキル、アルコキシ、アリール及びアリールオキシから構成される群から選択される】の化合物を含む光感受性リンカー。

85. リンカーが式II:



【式中、R²⁰はω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル、ω-ヒドロキシアルキル及びアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、ア

ルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アールオキシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、 R^{22} は水素及び（ジアルキルアミノ）（ ω -シアノアルコキシ） P -から構成される群から選択され、 X^{20} は水素、アルキル又は OR^{20} から構成される群

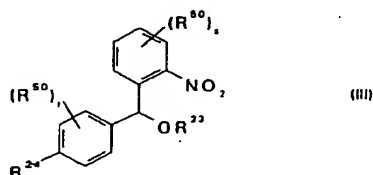
から選択される】で表される請求項84に記載の光開裂性リンカー。

86. R^{20} が3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピル、3-ヒドロキシプロピル及びメチルから構成される群から選択され、 R^{21} が水素、メチル及びカルボキシから構成される群から選択され、 R^{22} が水素及び（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ） P -から構成される群から選択され、 X^{20} が水素、メチル又は OR^{20} から構成される群から選択される請求項85に記載の光開裂性リンカー。

87. R^{20} が3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピルであり、 R^{21} がメチルであり、 R^{22} が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ） P -であり、 X^{20} が水素である請求項85に記載の光開裂性リンカー。

88. R^{20} がメチルであり、 R^{21} がメチルであり、 R^{22} が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ） P -であり、 X^{20} が3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロボキシである請求項86に記載の光開裂性リンカー。

88. 式(III)：



【式中、 R^{22} は水素及び（ジアルキルアミノ）（ ω -シアノアルコキシ） P -から構成される群から選択され、 R^{24} は ω -ヒドロキシアルコキシ、 ω -（4, 4

ルオキシ）-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項91に記載の光開裂性リンカー。

93. R^{24} が3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロボキシである請求項92に記載の光開裂性リンカー。

94. リンカーが1-（2-ニトロ-5-（3- O -4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ）フェニル）-1- O -（（2-シアノエトキシ）ジイソプロピルアミノホスフィノ）エタンと1-（4-（3- O -4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ）-3-メトキシ-6-ニトロフェニル）-1- O -（（2-シアノエトキシ）ジイソプロピルアミノホスフィノ）エタンから構成される群から選択される請求項84に記載の光開裂性リンカー。

'-ジメトキシトリチルオキシ）アルコキシ、 ω -ヒドロキシアルキル及び ω -（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキルから構成される群から選択され、アルキル又はアルコキシ鎖上で1個以上のアルキル基により置換されているものであってもよく、 r 及び s は各々独立して0~4であり、 R^{50} はアルキル、アルコキシ、アリール又はアリールオキシである】の化合物を含む光開裂性リンカー。

89. R^{24} が ω -ヒドロキシアルキル又は ω -（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキルであり、アルキル鎖上でメチル基により置換されている請求項88に記載の光開裂性リンカー。

90. R^{23} が水素及び（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノ

エトキシ） P -から構成される群から選択され、 R^{24} が3-ヒドロキシプロボキシ、3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロボキシ、4-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシ-1-プロピル、1-ヒドロキシ-2-プロピル、3-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル、2-ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、4-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）ブチル、3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）エチル、1-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-プロピル、3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項88に記載の光開裂性リンカー。

91. r と s が両方とも0である請求項90に記載の光開裂性リンカー。

92. R^{23} が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ） P -であり、 R^{24} が3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロボキシ、4-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）ブチル、3-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピ

ル、2-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）エチル、1-（4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-プロピル、3-（4, 4'-ジメトキシトリチ

【発明の詳細な説明】

マスマスベクトロメトリーに基づくDNA診断法

発明の背景

突然変異の検出

全生物（例えば動物、植物及び微生物）の遺伝情報はデオキシリボ核酸（DNA）でコードされている。ヒトでは、完全ゲノムは24染色体に位置する約100,000個の遺伝子から構成される（The Human Genome, T. Strachan, BIOS Scientific Publishers, 1992）。各ゲノムは、転写及び翻訳による発現後に生細胞内で特定の生化学機能を果たす特定タンパク質をコードする。DNA配列の変異は突然変異として知られており、生化学活性が変化したり、場合によっては失われたタンパク質を生じ、遺伝病の原因となる。突然変異にはヌクレオチド欠失、挿入又は置換（即ち点突然変異）がある。点突然変異には、タンパク質のアミノ酸配列に変異を生じる「ミスセンス」と、ストップコドンにコードしてタンパク質を切断する「ナンセンス」がある。

現在知られている遺伝病は3000種を超え（Human Genome Mutations, D. N. Cooper & M. Krawczak, BIOS Publishers, 1993）、血友病、タラセミア、デュシェン筋ジストロフィー（DMD）、ハンチントン病（HD）、アルツハイマー病及び嚕性線維症（CF）等がある。遺伝病の原因となる遺伝子の突然変異に加え、トリソミー21（ダウン症候群）、トリソミー13（パトー症候群）、トリソミー18（エドワーズ症候群）、モノソミーX（ターナー症候群）及び他の性染色体異常（例えばクライنفelter症候群（XXY））等の染色体異常による先天性欠損もある。更に、糖尿病、動脈硬化症、肥満、種々の自己免疫疾患及び癌（例えば結腸直腸癌、乳房癌、卵巣癌、肺）等の多数の疾病は特定のDNA配列が個体に要因を与えるらしいということが立証されつつある。

ウイルス、細菌、真菌及び他の感染性生物は宿主細胞に含まれる配列とは異なる特定核酸配列を含む。従って、感染性生物もその特定DNA配列に基づいて検

出及び同定することができる。

約16ヌクレオチドの配列はヒトゲノムのサイズでも統計的

に特異的であるので、比較的短い核酸配列を使用して高等生物における正常及び欠損遺伝子を検出し、感染性生物（例えば細菌、真菌、原生生物及び酵母）及びウイルスを検出することができる。同一種内の各個体の検出用フィンガープリントとしてDNA配列を使用することもできる（Thompson, J. S. と M. W. Thompson 編, *Genetics in Medicine*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA (1991) 参照）。

数種のDNA検出法が現在使用されている。例えば、増幅した核酸フラグメントの移動度をゲル電気泳動又は同定しようとする配列に相補的なプローブとのハイブリダイゼーションにより既知標準と比較することにより核酸配列を同定することができる。しかし、核酸フラグメントを感受性リポーター官能基（例えば放射性同位体 (^{32}P , ^{35}S)、蛍光又は化学発光）で標識しなければ同定することができない。放射性ラベルは危険であり、ラベルが発生するシグナルは経時的に減衰する。非同位体ラベル（例えば蛍光）は感度が不十分であり、高強度レーザーを使用する間にシグナルが減衰する。更に、標識と電気泳動後に検出するのは手間と時間がかかり、エラーが発生しやすい方

法である。電気泳動は核酸のサイズ又は分子量をゲルマトリックス中の移動度に直接関連することができないので特にエラーが発生しやすい。配列特異効果、二次構造及びゲルマトリックスとの相互作用がアーチファクトの原因であることが分かっている。

核酸の検出及び同定のためのマスマススペクトロメトリーの使用

マスマススペクトロメトリーは個々の分子を真空中でイオン化し、揮発により「飛翔」させることにより「計量する」手段である。電場及び磁場の併用作用下でイオンは夫々の個々の質量 (m) と電荷 (z) に応じた飛翔経路をたどる。低分子量分子の範囲では、マスマススペクトロメトリーは親分子イオンの質量の測定により

S/MSコンフィギュレーションでCIDにより二次イオン（フラグメントイオン）を生成することにより既知配列を確認するために使用されている。1例として、オリゴデオキシヌクレオチドの化学合成用保護ダイマープロックの合成にFABを適用した例が記載されている（Kosterら (1987) *Biomed. Environ. Mass Spectrometry* 14, 111-116）。

他のイオン化/脱着技術としては、エレクトロスプレー/イオンスプレー (ESI) 及びマトリックス助剤レーザーデソープション/イオン化 (MALDI) がある。ESマスマススペクトロメトリーはFennら (*J. Phys. Chem.* 88:4451-59 (1984); PCT出願第WO90/14148号) により開発され、現在の適用例は論文に要約されている（例

えばSmithら (1990) *Anal. Chem.* 62, 882-89及びArdrey (1992) *Electrospray Mass Spectrometry, Spectroscopy Europe* 4:10-18参照）。テトラデカヌクレオチド (Coveyら (1988) *The "Determination of Protein, Oligonucleotide and Peptide Molecular Weights by Ion Spray Mass Spectrometry," Rapid Commun. in Mass Spectrometry* 2:249-256参照) 及び21量体 (*Methods in Enzymol.*, 193, "Mass Spectrometry" (McCloskey編), p. 425, 1990, Academic Press, New York) の分子量が公表されている。マスマススペクトロメーターとしては、四重極が最も多く使用されている。多重イオンピークが存在し、その全てを質量計算に利用できるため、フェムトモル量の試料の分子量を非常に正確に測定できる。

他方、MALDIマスマススペクトロメトリーは飛行時間 (TO

F) コンフィギュレーション (Hillenkampら (1990) pp 49-

有機分子を分析及び特性決定する物理-有機手段の一つとして多来用いられている。更に、この親分子イオンと他の粒子（例えばアルゴン原子）を衝突させることにより分子イオンを断片化し、所謂衝突誘導解離 (CID) により二次イオンを形成する。断片化パターン/経路から詳細な構造情報が得られることは非常に多い。技術分野、特に生命科学ではマスマススペクトロメトリー法の多数の応用が知られている（例えば *Methods in Enzymol.*, Vol. 193:

"Mass Spectrometry" (J. A. McCloskey編), 1990, Academic Press, New York参照）。

マスマススペクトロメトリーは高い検出感度、質量測定精度、CIDとMS/MSコンフィギュレーション及び速度の組み合わせによる詳細な構造情報並びにオンラインコンピュータデータ転送を実現するという明白な分析上の利点があるため、核酸の構造分析にマスマススペクトロメトリーを使用することに関心が寄せられている。この分野を要約した最近の文献としては、K. H. Schram, "Mass Spectrometry of Nucleic Acid Components, Biomedical Applications of Mass Spectrometry" 34, 203-287 (1990) と、P. F. Crain, "Mass Spectrometric Techniques in Nucleic Acid Research," *Mass Spectrometry Reviews* 9, 505-554 (1990) があり、更に米国特許第5,547,835号及び同5,622,824号にも記載されている。

しかし、核酸は非常に揮発しにくい高極性バイオリマーである。従って、マスマススペクトロメトリー検出は低分子量合成オリゴヌクレオチドに限られ、親分子イオンの質量を測定することにより既知オリゴヌクレオチド配列を確認するため、あるいは特に高速原子衝突 (FABマスマススペクトロメトリー) 又はプラズマデソープション (PDマスマススペクトロメトリー) をイオン化及び揮発に使用してM

60 in "Matrix Assisted UV-Laser Desorption/Ionization: A New Approach to Mass Spectrometry of Large Biomolecules," *Biological Mass Spectrometry*, Burlingame and McCloskey編, Elsevier Science Publishers, Amsterdam) を質量分析計として使用する場合に有利であると思われる。殆どの場合、この技術では多重分子イオンピークが生成されないで、質量スペクトルは一般にESマスマススペクトロメトリーよりも単純に思われる。

分子量410,000ダルトンまでのDNA分子は脱着及び揮発されている (Williamsら, "Volatilization of High Molecular Weight DNA by Pulsed Laser Ablation of Frozen Aqueous Solutions," *Science* 246, 1585-87 (1989)) が、この技術は非常に低い分解能しか示していない (オ

リゴチミジル酸18ヌクレオチドまで、Huith-Fehrer *Rapid Commun. in Mass Specrom.*, 6, 209-13 (1992); DNAフラグメント500ヌクレオチド長まで、K. Tangら, *Rapid Commun. in Mass Specrom.*, 8, 727-730 (1994); 及び28塩基対の2本鎖DNA (Williamら, "Time-of-Flight Mass Spectrometry of Nucleic Acids by Laser Ablation and Ionization from a Frozen Aqueous Matrix," *Rapid Commun. in Mass Specrom.*, 4, 348-351 (1990))。日本特許第59-131909号は電気泳動、液体クロマトグラフィー又は高速ゲル濾過により分離した核酸フラグメントを検出する装置を記載している。DNA中に通常は存在しないS、Br、I又はAg、Au、Pt、Os、Hg等の原子を核酸に組み込むことによりマスマススペクトロメトリー

検出を実施している。

本願と同一名称の米国特許第5,622,824号はマスを

ベクトロメトリー検出に基づくDNAシーケンシング方法を記載している。これを実施するために、保護、酵素活性特異性又は固定化を利用し、エキソヌクレアーゼ消化によりDNAを段階的に片側分解し、ヌクレオチド又は誘導体をマスベクトロメトリーにより検出している。酵素分解前にクローン化DNAフラグメントに数組の定序欠失を作ることができる。こうして、エキソヌクレアーゼとDNA/RNAポリメラーゼの組み合わせを使用して質量改変ヌクレオチドを組み込むことができる。この結果、多重マスベクトロメトリー検出又はエキソヌクレアーゼの活性の調節が可能になり、分解プロセスを同期させることができる。本願と同一名称の米国特許第5,605,798号及び5,547,835号は生物試料における特定核酸配列の検出方法を提供している。これらの方法は、検出しようとする配列に応じて例えば診断法で使用する。これらの方法は用途が広く、多数の態様に適用できるが、この種の適用の最初の開示であるため、改善の余地がある。

従って、本発明の目的は生物試料中のDNA分子を配列決定及び検出するための改善方法を提供することである。本発明の別の目的は、遺伝病、所定の疾患の要因、癌及び感染を診断す

るための改善方法を提供することである。

発明の要約

本発明は、マスベクトロメトリーに基づいて核酸を検出及び/又は配列決定することによる診断法を提供する。MS分析を使用して2本鎖DNAを検出し、突然変異及び他の診断マーカーを検出する方法を提供する。特に、神経芽細胞腫を診断し、遺伝関係、HLA適合性、遺伝フィンガープリンティングを検出し、癌診断のためにテロメラーゼ活性を検出する方法を提供する。

所定の態様ではDNAを固体支持体に直接又はリンカー及び/又はビーズを介して固定化する。固定化DNAを使用するDNA検出法の3種の例を挙げる。(

一アルギニン基及びリジン基が挙げられる。他のリンカーも本明細書中に例示する。

本発明は、DNAの長いフラグメントを配列決定する方法を提供する。このような配列決定を実施するためには、特定塩基を末端にもつフラグメントをターゲット核酸から生成する。全長核酸でなくフラグメントを分析すると、測定しようとするイオンの質量は、一般にマスベクトロメトリーにより検出し易い低質量範囲にシフトする。例えば、低質量にシフトすると、質量分解能、質量精度及び特に検出感度が増す。ハイブリダイゼーションイベントとマスベクトロメトリーにより測定したフラグメントの実測分子量から配列情報が得られる(例えば突

然変異の存在及び/又は種類)。好ましい態様では、ハイブリダイゼーション及び/又はマスベクトロメトリー検出前にフラグメントを固体支持体に捕獲する。別の好ましい態様では、生成したフラグメントを並べてより大きい核酸の配列を提供する。

核酸から特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する方法の好ましい1例は、適量のターゲット核酸を適量の特異的エンドヌクレアーゼと接触させ、ターゲット核酸を部分的又は完全に消化することにより実施される。反応が完全に行われなくても、エンドヌクレアーゼは一般に配列を約50〜70ヌクレオチド以下の部分に分解する。好ましい態様では、核酸はリボ核酸であり、エンドヌクレアーゼはG特異的RNアーゼT₁、A特異的RNアーゼU₂、A/U特異的RNアーゼPhyM、U/C特異的RNアーゼA、C特異的ニワトリ肝RNアーゼ(RNアーゼCL3)又はクリサピチンから選択されるリボヌクレアーゼ(RNアーゼ)である。別の好ましい態様では、エンドヌクレアーゼはターゲット核酸内に含まれる少なくとも1個の部位を開裂する制限酵素である。特定塩基を末端にもつフラグメントを生成するための別の好ましい方法は、増幅と(例えば

連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性を持ち、ターゲットの指数増幅を生じる第1のDNAポリメラーゼと、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性を持ち、置換の塩基特異的停止を生じるポリメラーゼとを適量使用す

1) 鎖型の固定化; プライマーのハイブリダイゼーション; プライマーの伸長又はシーケンシングもしくは診断用プライマー(1本鎖ddNTP)の伸長又はプライマーの伸長とエンドヌクレアーゼ分解(シーケンシング); (2) プライマーの固定化; 1本鎖鎖型のハイブリダイゼーション; 及びプライマーの伸長又はシーケンシングもしくは診断用プライマー(1本鎖ddNTP)の伸長又はプライマーの伸長とエンドヌクレアーゼ分解(シーケンシング);

(3) プライマーの固定化; 2本鎖鎖型のハイブリダイゼーション; プライマーの伸長又はシーケンシングもしくは診断用プライマー(1本鎖ddNTP)の伸長又はプライマーの伸長とエンドヌクレアーゼ分解(シーケンシング)。

所定の態様では選択的に開裂可能なリンカーを介してDNAを支持体に固定化する。選択的に開裂可能なリンカーの非限定的な例としては光開裂性リンカー、化学開裂性リンカー及び酵素(例えば制限部位(核酸リンカー)、プロテアーゼ部位)開裂性リンカーが挙げられる。選択的に開裂可能なリンカーを加えると、MALDI-TOF MSに適したDNAの全固定化が可能になり、核酸の3'又は5'末端を介してDNAを支持体に結合でき、増幅DNA又はターゲットプライマーをDNA合成により伸長することができ、更に伸長産物(又はエキソヌクレアーゼ分解による分解産物)をMALDI-TOF MS分析に適した寸法にすることができる(即ち単離又は合成DNAを大きくすることができ、小さいプライマー又は大きいプライマー配列を使用して遺伝子の小さい制限フラグメント又はその1本鎖をハイブリダイズすることができる)ので、MALDI-TOF MS分析の機能が広がる。

好ましい態様では、選択的に開裂可能なリンカーはマスベクトロメトリーのイオン化段階中に開裂される化学又は光開裂性リンカーである。リンカーの例としては、ジスルフィド基、ロイビニル基、酸レービルトリチル基及び疎水性トリチル基を含むリンカーが挙げられる。他の態様では、酵素開裂性リンカーとして、RNAヌクレオチドであるか又は制限エンドヌクレアーゼ部位をコードする核酸を利用できる。他の酵素開裂性リンカーとしては、ピロリン酸基、アルギニン

る)塩基特異的ターミネーション反応を併用実施する。ターゲット核酸の5'及び/又は3'末端にタグを付けると、フラグメントを並べ易くなる。

本発明は未知核酸の配列の決定方法として、ターゲット核酸の5'及び/又は3'末端にタグを付けてもよい方法を提供する。3'末端に非天然タグを付けても有用であり、3'不均一性、早期停止及び非特異的伸長の影響を防止又は補償できる。好ましい態様では、タグはアフィニティータグ(例えばビオチン又は捕獲核酸にハイブリダイズする核酸)である。アフィニティータグは核酸を固体支持体に結合し易くするものが最も好ましい。別の好ましい態様では、タグは質量マーカー(即ち4種のヌクレオチドのいずれの質量にも対応しない質量のマーカー)である。更に別の態様では、タグはポリAテール又は例えば転写反応に起因し得る天然3'不均一性等の天然タグである。

本発明は、生物試料から得た核酸分子から核酸を複製し、1

種以上のヌクレアーゼ(DNAにはデオキシリボヌクレアーゼ及びRNAにはリボヌクレアーゼ)を使用して特異的に消化する配列分析方法を提供する。対応する相補的配列を担持する固体支持体にフラグメントを捕獲させる。ハイブリダイゼーションイベントと捕獲ターゲット配列の実測分子量から遺伝子の突然変異に関する情報が得られる。マスベクトロメトリーを使用してアレーをスポット毎に分析することができる。更に、生成したフラグメントを並べると、より大きいターゲットフラグメントの配列が得られる。

別の態様では、予想される突然変異を検出しようとする部位の近傍で、3'末端塩基をもつ少なくとも1個のプライマーをターゲット核酸にハイブリダイズする。3種のヌクレオシド三リン酸(NTTP)にターミネーターとしての第4のヌクレオシド三リン酸を加えた1組のヌクレオシド三リン酸と適当なポリメラーゼを反応させる。伸長反応産物をマスベクトロメトリーにより測定し、突然変異の存在及び種類を調べる。3種のNTTPと1種のdd-NTTP(又は3種のNTTPと1種の3'-デオキシNTTP)の組み合わせを変えると、ターゲット核酸配列中の(複合ヘテロ接合体を含む)数種の突然変異を区別する

ことができる。

本発明は、組織又は細胞試料中の新形成／悪性の検出及び診断方法を提供する。本方法はテロメア反復増幅プロトコル(TRAAP)－MSアッセイに基づき、

- a) 臨床単離物又は被疑細胞培養物等の組織又は細胞試料を得る段階と、
- b) 試料からテロメラーゼを単離／抽出／精製する段階と、
- c) 合成DNAのテロメラーゼ特異的伸長を生じる条件下で、場合により固定化したテロメア反復に相補的な合成DNAプライマーと全4種のdNTPを含む組成物にテロメラーゼ抽出物を加える段階と、
- d) 好ましくはチオール化学又はストレプトアビジンに基づく部分等の「リンカー部分」を含むプライマーを使用してテロメラーゼ伸長DNA産物を増幅する段階と、
- e) 例えば固体支持体に固定化した相補的結合パートナーを使用してリンカー増幅プライマーを単離する段階と、
- f) 場合によりDNAを結晶形成のために条件付けする段階と、
- g) 試料をイオン化／揮発させることによりMSを実施し、DNA産物を検出する段階を含む。テロメラーゼ特異的伸長は新

形成／悪性を表す。この方法を使用すると、特定悪性を検出することができる。MSを使用してDNA産物を検出すると、試料中のテロメラーゼ活性を表す伸長産物を同定することができる。所望により、合成DNAはアレー形態でもよい。

本発明は、癌遺伝子の突然変異の検出方法と、新形成を表す形質転換細胞をスクリーニングするためのその使用を提供する。癌遺伝子に存在する突然変異の検出は形質転換を表す。本方法は、

- a) 生物試料を得る段階と、
- b) 1個のプライマーが固定化のためのリンカー部分をもつようにして形質転換を表すコドンを含む選択した癌遺伝子の一部を増幅する段階と、
- c) 場合によりアレーの形態で固体支持体にリンカー部分を介してDNAを固定化する段階と、
- d) コドンの上流の癌遺伝子配列に相補的なプライマーをハイブリダイズする

- a) 増幅法又は1本鎖DNAフラグメントのハイブリダイゼーションにより形成したMSに適した寸法の2本鎖DNAを単離する段階と、
- b) dsDNA:ssDNA比を増加する条件として、低温(即ち4℃)で分析用試料を調製すること、マトリックス中で高いDNA濃度を使用してデュプレックス形成を誘導することのうちの1つ又は全部を含む条件下で分析用2本鎖DNAを調製する段階と、
- c) 例えばイオン化用閥値照射を僅かに上回るレベルにレーザー出力を調節することにより、デュプレックスDNAの維持を助長するように低いイオン加速電圧を使用して段階b)の試料をイオン化／揮発させる段階と、

- d) 適当な質量のdsDNAの存在を検出する段階を含む。好ましい態様では、マトリックスは3-ヒドロキシピコリン酸を含む。検出されるDNAは遺伝異常、遺伝病、疾患染色体異常の遺伝素因を表す。他の態様では、2本鎖DNAの質量は欠失、挿入、突然変異を表す。

本発明は、プライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)と呼ぶ方法を提供する。この方法は単一検出プライマーを使用した後、オリゴヌクレオチド伸長段階を実施し、MALDI-TOFマスマスペクトロメトリーにより容易に分解可能な産物を得る。産物は多数の反復単位又は反復領域内の第2の部位突然変異に特異的な数の塩基分だけ長さが異なる。この方法の1例では、ヒト染色体21に位置するインターフェロナーαレセプター遺伝子のイントロン5におけるA1uVpA多型性と、ヒト染色体7に位置するCFTR遺伝子からのイントロン8のスプライス受容部位のポリTトラクトをモデルシステムとして使用する。この方法は例えばマイクロサテライトDNAのPROBE-MS分析を使用して突然変異、家族関係、HLA適合性及び他の同様のマーカーの種類を決定し、同定するために使用すると有利である。好ましい態様では、本方法は、

- a) 2個の個体から生物試料を得る段階と、
- b) 2個以上のマイクロサテライトDNA反復配列を含む各個体からのDNAの領域を増幅する段階と、

段階と、

- e) 3dNTP/1ddNTPとDNAポリメラーゼを加え、ハイブリダイズしたプライマーを次のddNTPロケーションまで伸長する段階と、

- f) 試料をイオン化／揮発させる段階と、
- g) 伸長DNAの質量を検出し、質量によって野生型対立遺伝子が存在するか又は突然変異対立遺伝子が存在するかを判断し、コドンに突然変異対立遺伝子が存在する場合には新形成であると診断する段階を含む。1態様では、伸長-MS分析を使用してレトロウイルス(RET)癌遺伝子における突然変異コドン634の存在を検出する。

別の態様では、形質転換細胞で発現される遺伝子の逆転写と増幅を使用して疾患を診断する方法を提供する。特に、腫瘍細胞では発現されるが、正常骨髄細胞等の正常細胞では発現されないカテコールアミン生合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの逆転写酵素(RT)-MSを使用して神経芽細胞腫を診断する方法を提供する。本方法は、

- a) 組織試料を得る段階と、
- b) 試料からポリARNAsを単離する段階と、
- c) 逆転写を使用してcDNAライブラリーを調製する段階と、
- d) 1個のオリゴプライマーがリンカー部分をもつようにして選択した遺伝子のcDNA産物又はその一部を増幅する段階と、
- e) リンカー部分を介してDNAを固体支持体に固定化するこ

とにより増幅産物を単離する段階と、

- f) 場合によりDNAを条件付けする段階と、
- g) 試料をイオン化／揮発させ、選択した遺伝子の発現を表すDNAピークの存在を検出する段階を含む。例えば、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子の発現は神経芽細胞腫を表す。

MALDI-TOF MSを使用して2本鎖核酸を直接検出する方法も提供する。これらの方法は、

- c) 増幅したDNAをイオン化／揮発させる段階と、
- d) 増幅したDNAの存在を検出し、増幅したDNAの分子量を比較し、分子量が相違する場合には不一致(即ち野生型と突然変異)、非遺伝又は非適合性と判断し、フラグメントの寸法が同様の場合には、一致、家族関係又はHLA適合性の可能性があるかと判断する段階を含む。

異なるリンカー部分をもつプライマーを固定化に使用し、2種以上のマーカーを同時に試験することもできる。

突然変異、特に主要疾患の原因となる突然変異又は一般的多型性を検出するための別法として、ループプライマーオリゴ塩基伸長法LOOP-PROBEと呼ぶ方法も提供する。特定態様では、本方法は試料中のターゲット核酸の検出方法であり、

- a) (i) ターゲットコドンのすぐ下流のターゲットDNAの一部に一致する5'末端と、β-グロブリンの場合にはCfoI等の固有限制エンドヌクレアーゼ部位をアンプリコンに導入する配列と、自己相補的な3'末端をもつ第1のプライマーと、

- (ii) ストレプトアビジンビーズ等の固体支持体にDNAを固定化するためのビオチン等のタグを含む第2の下流プライマーを使用して試料中のβ-グロブリン等のターゲット核酸配列を増幅する段階と、

- c) リンカー部分を介して2本鎖増幅DNAを固体支持体に固定化する段階と、
- d) 固定化DNAを変性させ、非固定化DNA鎖を単離する段階と、
- e) 3'末端をポリメラーゼにより伸長できるように、例えば加熱後に約37℃まで冷却するか又は他の適当な方法により、単離した非固定化DNA鎖の3'末端の内部相補的配列をアニールする段階と、
- f) DNA鎖の3'末端がDNAポリメラーゼにより次のddNTPロケーション(即ち突然変異ロケーション)まで伸長するように、DNAポリメラーゼ、3dNTP/1ddNTPを加えてアニールしたDNAを伸長する段階と、
- g) 伸長した2本鎖ステムループDNAを固有限制エンドヌクレアーゼで開裂し、開裂したステムループDNAを除去する段階と、

i) (場合によりマトリックスを加えて) 伸長反応をイオン化/揮発させる段階と、

j) 伸長したターゲット核酸の存在を検出し、野生型と質量の異なるDNAフラグメントが存在する場合にはターゲットコドンに突然変異が存在すると判断する段階を含む。この方法は他のMS突然変異分析法と比較して特定の突然変異検出用試薬を使用する必要がないので、プロセスが簡単になり、自動化し易い。また、分析する特定伸長産物はプライマーから開裂されるので、他の方法よりも短い。更に、アニーリング効率は添加したプライマーのアニーリングよりも高いので、より多量の産物を生成できる。この方法は多量化及び種々の検出スキーム(例えば単塩基伸長、オリゴ塩基伸長及びシーケンシング)に適合可能である。例えば、ルーブプライマーの伸長を使用して高度多型性領域内で短い診断シーケンシングリーダーを生成し、例えばHLA型別又は耐性及び種型別を実施することが出来る。

別の態様では、RNA増幅を使用して生物試料中のターゲット核酸を検出する方法が提供される。本方法では、ターゲット配列に相補的な領域をもち、上流でT7プロモーター等のプロモーターをコードするプライマーを使用してターゲット核酸を

増幅する。DNA依存性RNAポリメラーゼと適当なリボスクレアーゼを加えてRNAを合成し、MSにより分析する。

本発明は、MSを使用してDNAを配列決定する改善方法を提供する。これらの方法では、MS分析の前に増幅用サーモサイクリングを使用してシグナルを増加する。

本発明はMS分析用プライマーも提供する。特に、配列番号1~22、24、27~38、41~86、89、92、95、98、101~110、112~123、126、128、129に示すヌクレオチド配列の配列のいずれかの塩基又は長いオリゴヌクレオチドで少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマーと、配列番号280~287に示すプライマーを提供する。プライマーは標識されておらず、場合により好ましくは5'末端に質量変更部分

S)であるターゲット配列(T)上の相補的配列と特異的に相互作用するように選択する。ターゲット検出部位(TDS)が突然変異Xを含む場合には、マスマスベクトロメトリーにより検出部位を野生型から区別することができる。突然変異が分子の中間に位置し、従って野生型デテクターオリゴヌクレオチド(D^{wt})を例えば対照としてのターゲットデテクター配列と接触させる場合に安定なハイブリッドを形成しないようにデテクター核酸分子(D)をデザインすることが好ましい。突然変異位置に対照塩基をもつ突然変異デテクターオリゴヌクレオチド(D^{mut})をハイブリダイゼーションに使用しても突然変異を検出することができる。生物試料から得た核酸分子が特定配列に関してヘテロ接合である(即ちD^{wt}とD^{mut}を含む)場合には、a p pと検出しようとするD^{wt}にD^{wt}とD^{mut}を同時に結合する。

図2は1個のターゲット配列で数個の突然変異を同時に検出する方法を示す図である。デテクターオリゴヌクレオチドD1、D2及びD3間の分子量は同時検出(多量化)を可能にするために十分大きくなければならない。これは配列自体(組成又は長さ)によっても得られるし、質量変更官能基M1~M3をデテクターオリゴヌクレオチドに導入しても得られる。

図3は更に別の多量検出フォーマットを示す図である。この態様では、平坦表面(例えば「チップアレイ」)に位置特異的に固定化した種々の特定捕獲配列を使用することにより区別する。異なるターゲット配列T1~Tnが存在する場合には、それらのターゲット捕獲部位TCS1~TCSnは相補的固定化捕獲配列C1~Cnと相互作用する。配列自体又は質量変更官能基M1~Mnにより適当に質量差をつけたデテクターオリゴヌクレオチドD1~Dnを使用することにより検出する。

図4は核酸(即ちPCR)増幅を使用して予めデザインしたターゲット捕獲部位(TCS)をターゲット配列に組み込むフォーマットを示す図である。(例えばビオチンとストレプトアビジンをコートした磁性ビーズの相互作用を利用して)一方の

を含む。

以下、図面、詳細な説明及び請求の範囲により本発明の方法の他の特徴及び利点を更に説明する。

図面の簡単な説明

図1Aは生物試料から得たターゲット核酸分子(T)内に含まれる1個のターゲット検出部位(TDS)でマスマスベクトロメトリー分析を実施するための方法を示す図である。スぺーサー

(S)を介して固体支持体(SS)に特定捕獲配列(C)を結合する。捕獲配列はターゲット捕獲部位(TCS)として知られるターゲット核酸分子(T)上の相補的配列に特異的にハイブリダイズするように選択する。スぺーサー(S)は円滑なハイブリダイゼーションを助長する。次いで、TDSに相補的なデテクター核酸配列(D)をTDSと接触させる。マスマスベクトロメトリーによりDとTDSのハイブリダイゼーションを検出することができる。

図1Bは固体支持体に直接結合することにより少なくとも1個のターゲット検出部位(ここではTDS1とTDS2)でマスマスベクトロメトリー分析を実施するための方法を示す図である。ターゲット核酸分子(T)上の適当な官能基(L')と固体支持体上の適当な官能基(L)の間に形成される可逆的又は不可逆的結合の形成により、ターゲット検出部位(TDS1及びTDS2)を含むターゲット配列(T)を固体支持体に固定化する。次いで、ターゲット検出部位(TDS1又はTDS2)に相補的なデテクター核酸配列(ここではD1とD2)をTDSと接触させる。分子間差に基づいてTDS1とD1及び/又はTDS2とD2のハイブリダイゼーションを検出及び区別す

ることができる。

図1Cはターゲット(T)核酸配列における野生型(D^{wt})及び/又は突然変異(D^{mut})配列の検出方法を示す図である。図1Aと同様に、スぺーサー(S)を介して特定捕獲配列(C)を固体支持体(SS)に結合する。更に、捕獲配列はハイブリダイゼーションにより検出しようとするターゲット捕獲部位(TC

鎖のみを捕獲し、他方を除去する。ビオチンをプライマー1に結合する場合には、他方の鎖はTCSにより適当に標識すればよい。検出は上記と同様にマスマスベクトロメトリーにより対応するターゲット検出部位TDSと特定デテクターオリゴヌクレオチドDの相互作用により行なう。

図5は増幅(ここではリガーゼ連鎖反応(LCR))産物を調製し、マスマスベクトロメトリーにより検出する方法を示す図である。プライマー(夫々P1及びP4)に結合した質量変更官能基(M1及びM2)により質量差をつけることができる。マスマスベクトロメトリーによる検出は直接(即ち固定化及びターゲット捕獲部位(TCS)を使用せずに)実施することができる。捕獲配列(C)の規則アレーを構成することにより多重LCR反応を並行して実施することができる。このフォーマットは連結産物を分離し、質量差が十分である場合にはマスマスベクトロメトリー又は多量化によりスポット毎に同定できる。

図6Aは転写増幅法により増幅した核酸分子のマスマスベクトロメトリー分析を示す図である。RNA配列をそのTCS配列を介して捕獲すると、適当なデテクターオリゴヌクレオチド(D)を使用することにより上記と同様に野生型及び突然変異

ターゲット検出部位を検出することができる。

図6Bは質量変更デテクターオリゴヌクレオチドM1-D1及びM1-D2を使用して同一RNA上の2個の異なる(突然変異)部位を同時に検出するための多量化を示す図である。

図6Cは質量変更ジデオキシヌクレオチド又は3'-デオキシヌクレオチド三リン酸とRNA依存性DNAポリメラーゼを使用することにより特定突然変異を検出するための別の多量化方法を示す図である。あるいは、DNA依存性RNAポリメラーゼとリボヌクレオチド三リン酸を使用してもよい。このフォーマットは突然変異の部位(X)に予想される全4種の塩基を同時に検出することができる。

図7Aは生物試料から得たターゲット核酸分子(T)内に含まれる1個のターゲット検出部位(TDS)でマスマスベクトロメトリー分析を実施するための方法

を示す図である。スパーサー (S) を介して固相支持体 (SS) に特定捕獲配列 (C) を結合する。捕獲配列はターゲット捕獲部位 (TCS) として知られる T 上の相補的配列に特異的にハイブリダイズするように選択する。TDS の一部に相補的な核酸分子を TDS 内の突然変異部位 (X) の TDS 5' にハイブリダイズする。完全な 1

組のジデオキシヌクレオシド又は 3' -デオキシヌクレオシド三リン酸 (例えば pppAdd, pppTdd, pppCdd 及び pppGdd) と DNA 依存性 DNA 又は RNA ポリメラーゼを加えると、X に相補的な 1 個のジデオキシヌクレオシド又は 3' -デオキシヌクレオシド三リン酸のみを組み込むことができる。

図 7 B は核酸分子内の潜在突然変異部位 (M) における突然変異の存在を調べるためにマスマスベクトロメトリー分析を実施する方法を示す図である。このフォーマットは 2 本鎖ターゲット核酸分子の対立遺伝子 (A) 及び (B) を同時に分析することができ、ホモ接合正常、ホモ接合突然変異又はヘテロ接合を診断することができる。M を含む領域内で A 及び B とハイブリダイズする相補的オリゴヌクレオチド (夫々 (C) 及び (D)) に対立遺伝子 A 及び B を各々ハイブリダイズさせる。次いで各ヘテロデュプレックスを 1 本鎖特異的エンドヌクレアーゼと接触させ、M に突然変異の存在を示すミスマッチがあれば (C) 及び/又は (D) が開裂するので、マスマスベクトロメトリーにより検出することができる。

図 8 は逆向きロケーションに 2 種の異なるプロモーター (例

えば SP6 と T7 プロモーター) をもつ転写ベクターを使用して検出するためにターゲット DNA の両鎖を調製する方法を示す図である。このフォーマットはヘテロ接合ターゲット検出部位 (TDS) を検出するのに特に有用である。SP6 又は T7 RNA ポリメラーゼを使用すると、両鎖を別々又は同時に転写させることができる。転写した RNA 分子は、適当に質量差をつけたデテクターオリゴヌクレオチドを使用して特異的に捕獲し、同時に検出することができる。これは溶液中で直接実施することもでき、特異的に固定化した捕獲配列の規則アレー

び区別できることを示しており、夫々混合物 (上段)、18 量体 (中段) 及び 19 量体からのピーク (下段) を示す。

図 13 は実施例 3 に記載するような顕性線維症突然変異 ΔF508 の検出方法の図である。

図 14 は実施例 3 の ΔF508 ホモ接合正常の DNA 伸長産物の質量スペクトルである。

図 15 は実施例 3 の ΔF508 ヘテロ接合突然変異の DNA 伸長産物の質量スペクトルである。

図 16 は実施例 3 の ΔF508 ホモ接合正常の DNA 伸長産物の質量スペクトルである。

図 17 は実施例 3 の ΔF508 ホモ接合突然変異の DNA 伸長産物の質量スペクトルである。

図 18 は実施例 3 の ΔF508 ヘテロ接合突然変異の DNA 伸長産物の質量スペクトルである。

図 19 は実施例 4 のアポリボタンパク質 E 遺伝子型別を実施するための種々の方法の図である。

図 20 は E3 対立遺伝子 (図 20 B) によりコードされる正常アポリボタンパク質 E と、E2 及び E4 対立遺伝子 (図 20 A) によりコードされる他のインタイプの核酸配列を示す。

図 21 A は CfoI 制限エンドヌクレアーゼを使用したアポリボタンパク質 E の種々の遺伝子型の複合制限パターンを示す。

図 21 B はアポリボタンパク質 E の種々の遺伝子型について 3.5% Met Phor Agarose Gel 中で得られた制限パターンを示す。

図 21 C はアポリボタンパク質 E の種々の遺伝子型について 12% ポリアクリルアミドゲル中で得られた制限パターンを示す。

図 22 A はアポリボタンパク質 E の E2、E3 及び E4 対立遺伝子の制限酵素分解により得られた 91、83、72、48 及び 35 塩基対フラグメントの分子質量を示すチャートである。

特表 2002-507883

上で多数のターゲット配列を並行処理することにより実施することもできる。

図 9 は 1 種以上のリボヌクレアーゼと対応する相補的配列を担持する固体支持体に捕獲したフラグメントを使用して図 6、7 及び 8 に示したように調製した RNA を特異的に消化する方法を示す図である。ハイブリダイゼーションイベントと捕獲したターゲット配列の実測分子量から、遺伝子中の突然変異の有無とその存在位置に関する情報が得られる。アレーはマスマスベクトロメトリーを使用してスポット毎に分析することができる。DNA は制限エンドヌクレアーゼを含むヌクレアーゼカクテル

を使用して消化することもできる。個々の特定フラグメントの分子量と野生型フラグメントの分子量の差により突然変異を検出することができる。

図 10 A は後記実施例 1 に記載する実験により得られた UV スペクトルを示す。パネル i) はハイブリダイゼーション前の 26 量体の吸収を示す。パネル ii) はハイブリダイゼーション後の遠心分離濾液を示す。パネル iii) は第 1 回目の 50 mM クエン酸アンモニウム洗浄後の結果を示す。パネル iv) は第 2 回目の 50 mM クエン酸アンモニウム洗浄後の結果を示す。

図 10 B は 3 回の洗浄/遠心分離段階後の後記実施例 1 に記載する実験により得られた質量スペクトルを示す。

図 10 C は後記実施例 1 に記載する実験により得られた質量スペクトルを示し、図 1 B に模式的に示したフォーマットに従ってハイブリダイズした 26 量体をビーズから脱着できることを示している。

図 11 は後記実施例 1 に記載する実験により得られた質量スペクトルを示し、図 1 B に模式的に示したような実験でハイブリダイズした 40 量体を脱着できることを実証している。検出

効率は、40 量体よりも著しく長いフラグメントでも脱着できることを示唆している。

図 12 は後記実施例 2 に記載する実験により得られた質量スペクトルを示し、エレクトロスプレーマスマスベクトロメトリーにより 18 量体と 19 量体を脱着及

図 22 B はホモ接合 E4 アポリボタンパク質 E 遺伝子型の制限消化産物の質量スペクトルである。

図 23 A はホモ接合 E3 アポリボタンパク質 E 遺伝子型の制

限消化産物の質量スペクトルである。

図 23 B は E3/E4 アポリボタンパク質 E 遺伝子型の制限消化産物の質量スペクトルである。

図 24 は 7.5% ポリアクリルアミドゲルに各増幅試料 10% (5 µl) を加えた実施例 5 のオートラジオグラフである。試料 M: A1uI で消化した pBR322; 試料 1: 血清分析で HBV 陽性; 試料 2: 同じく HBV 陽性; 試料 3: 血清分析しなかったが、トランスアミナーゼ濃度が増加しており、肝炎の徴候を示す; 試料 4: HCV を含む HBV 陽性; 試料 5: HBV 陽性; (ー) 陰性対照; 陽性 (+) 対照。染色は臭化エチジウムを用いて実施した。

図 25 A は HBV 陽性の試料 1 の質量スペクトルである。20754 Da のシグナルは HBV 関連増幅産物を表す (67 ヌクレオチド、計算分子量 20735 Da)。10390 Da の質量シグナルは [M+2H]²⁺ 分子イオンを表す (計算値 10378 Da)。

図 25 B は血清及びドットブロットアッセイで HBV 陽性の核酸 (即ち PCR) に対応する試料 3 の質量スペクトルである。増幅産物は微量しか生成されていない。しかし、20751

Da (計算質量: 20735 Da) にはっきり検出される。10397 Da の質量シグナルは [M+2H]²⁺ 分子イオンを表す (計算値 10376 Da)。

図 25 C は HBV 陽性かつ HCV 陽性の試料 4 の質量スペクトルである。HBV 特異的シグナルは検出されなかった。

図 26 は実施例 6 のリガーゼ連鎖反応 (LCR) で使用した相補的オリゴヌクレオチドの結合部位をもつ大腸菌 lacI 遺伝子の一部を示す。ここでは野生型配列を示す。突然変異体は連結部位でもある b p 191 に点突然変異を含む (太字)。突然変異は C→T 転位 (及び G→A 転位) である。この結果、オリゴ B と

T-Gミスマッチ（及びオリゴCとA-Cミスマッチが生じる。

図27は臭化エチジウムで染色した実施例6の7.15%ポリアクリルアミドゲルである。M：鎮長標準（MspIで消化したpUC19 DNA）。レーン1：野生型鋳型を用いたLCR。レーン2：突然変異鋳型を用いたLCR。レーン3：（対照）鋳型を用いないLCR。連結産物（50 bp）は野生型鋳型を含む陽性反応のみで生成された。

図28は2種の陽性LCRのプールのHPLCクロマトグラム

ムである。

図29は突然変異鋳型以外は同一条件を使用したHPLCクロマトグラムを示す。連結産物の小さいシグナルは遊離体の鋳型なし連結又は（G-T、A-C）ミスマッチでの連結に起因する。「偽陽性」シグナルは図28に示す野生型鋳型を用いた連結産物のシグナルよりも著しく弱い。連結遊離体を分析すると、オリゴヌクレオチドの2個が5'リン酸化されているので「二重ピーク」となっている。

図30（b）は実施例6のPfu DNAリガーゼ溶液のMALDI-TOF-MS分析により得られた複合シグナルパターンを示す。（a）は未精製LCRのMALDI-TOFスペクトルを示す。質量シグナル67569 DaはPfu DNAリガーゼを表すと思われる。

図31は2種の陽性LCRのプールのMALDI-TOFスペクトルを示す（a）。7523 Daのシグナルは未連結オリゴA（計算値7521 Da）を表し、15449 Daのシグナルは連結産物（計算値15450 Da）を表す。3774 DaのシグナルはオリゴAの[M+2H]²⁺シグナルである。2000 Da未満の質量範囲のシグナルはマトリックスイオンに起因する

る。スペクトルは図27のレーン1と図28のクロマトグラムに対応する。（b）は2種の陰性LCR（突然変異鋳型）のプールのスペクトルを示す。7517 DaのシグナルはオリゴA（計算値7521 Da）を表す。

図32は（鋳型としてサケ精子DNAを用いた）2種の対照反応産物プールの

9量体順プライマーと、2種の18量体逆プライマーの配列を示す。

図37は未修飾及び7-デアザプリンを含む103量体核酸の核酸増幅に実施例8で使ったM13mp18 RFI DNAのヌクレオチド配列の部分を示す。核酸増幅反応で使った17量体のヌクレオチド配列も示す。

図38は実施例8に記載した増幅産物をMALDI-TOF-MS分析用に精製及び濃縮したもののポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す。M：鎮長マーカー、レーン1：7-デアザプリンを含む99量体増幅産物、レーン2：未修飾99量体、レーン3：7-デアザプリンを含む103量体及びレーン4：未修飾103量体増幅産物。

図39：5' - [32P] 標識プライマー1及び4を用いて実施した核酸（即ちPCR）反応産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動のオートラジオグラム。レーン1及び2：未修飾及び7-デアザプリンで修飾した103量体増幅産物（53321及び23520カウント）、レーン3及び4：未修飾及び7-

デアザプリンで修飾した200量体（71123及び39582カウント）、レーン5及び6：未修飾及び7-デアザプリンで修飾した99量体（173216及び94400カウント）。

図40：a）未修飾103量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル（合計12個の単照射スペクトル）。2本の1本鎖の計算質量値（31768 uと31759 u）の平均値は31763 uである。質量分解能：18。b）7-デアザプリンを含む103量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル（合計3個の単照射スペクトル）。2本の1本鎖の計算質量値（31727 uと31719 u）の平均値は31723 uである。質量分解能：67。

図41：a）未修飾99量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル（合計20個の単照射スペクトル）。2本の1本鎖の計算質量値は30261 uと30794 uである。b）7-デアザプリンを含む99量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル（合計12個の単照射スペクトル）。2本の1本鎖の計算質量値は30224 uと30750 uである。

図42：a）未修飾200量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル

待表2002-507883

スペクトルを示す。2000 Da以上の質量範囲のシグナルはTween 20に起因し、予想通り、オリゴAしか検出できなかった。

図33は2種の陽性LCRプールのスペクトルを示す（a）。精製は本文に記載するように限外濾過とストレプトアビジンDynaBeadsを併用して実施した。15448 Daのシグナルは連結産物を表す（計算値15450 Da）。7527 DaのシグナルはオリゴAを表す（計算値7521 Da）。3761 DaのシグナルはオリゴAの[M+2H]²⁺シグナルであり、5140 Daのシグナルは連結産物の[M+3H]²⁺シグナルである。（b）は2種の陰性LCRプール（鋳型なし）のスペクトルを示す。7514 DaのシグナルはオリゴAを表す（計算値7521 Da）。

図34は実施例7に記載するような突然変異検出プライマー

のオリゴ塩基伸長の模式図であり、夫々ddTTP（A）又はddCTP（B）を反応混合物で使用している。理論質量計算値を括弧内に示す。図示配列は最も一般的な囊胞性線維症突然変異ΔF508とより低頻度の突然変異Δ1507とIle506SerをもつCFTR遺伝子のエキソン10の一部である。

図35は突然変異検出のためにオリゴ塩基伸長プライマー沈殿から直接記録したMALDI-TOF-MSスペクトルである。（A）及び（B）のスペクトルは夫々それ以上伸長反応せずにアニールしたプライマー（CF508）を示す。パネルCは伸長反応でpppTddを使用した野生型のMALDI-TOFスペクトルを示し、DはpppCddをターミネーターとして使用した場合の506S突然変異をもつヘテロ接合伸長産物を示す。パネルE及びFは伸長反応でpppTdd及びpppCddをターミネーターとして使用したΔF508をもつヘテロ接合体を示す。パネルG及びHはpppTdd及びpppCddをターミネーターとして使用したヘテロ接合ΔF508突然変異を示す。診断の鋳型は各スペクトルの下に記載し、実測/予想分子量を括弧内に記載する。

図36は未修飾及び7-デアザプリンを含む99量体及び200量体核酸の核酸増幅用鋳型として実施例8で使ったpRFc1 DNAの配列の部分と、1

（合計30個の単照射スペクトル）。2本の

1本鎖の計算質量値（61873 uと61595 u）の平均値は61734 uである。質量分解能：28。b）7-デアザプリンを含む200量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル（合計30個の単照射スペクトル）。2本の1本鎖の計算質量値（61772 uと61714 u）の平均値は61643 uである。質量分解能：39。

図43：a）リボ修飾プライマーを用いて増幅した7-デアザプリンを含む100量体増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル。2本の1本鎖の計算質量値（30529 uと31095 u）の平均値は30812 uである。b）加水分解プライマー開裂後の増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトル。2本の1本鎖の計算質量値（25104 uと25229 u）の平均値は25167 uである。開裂したプライマー（5437 uと5918 u）の平均値は5677 uである。

図44 A~Dは3' ビオチン化によりストレプトアビジンビーズに固定化した39量体鋳型（配列番号23）から得た4種のシーケンシングラダーのMALDI-TOF質量スペクトルを示す。実施例9によるシーケンシングでは14量体プライマー（配列番号24）を使用した。

図45は3' ビオチン化によりストレプトアビジンビーズに固定化した78量体鋳型（配列番号25）の固相シーケンシングのMALDI-TOF質量スペクトルを示す。シーケンシングでは18量体プライマー（配列番号26）とddGTPを使用した。

図46は1本鎖オーバーハングをもつデュプレックスDNAプローブが特定DNA鋳型を捕獲すると共に固相シーケンシング用プライマーとしても機能することを示すスキームである。

図47 A~Dは実施例9に記載するように5塩基オーバーハングを残して3' ビオチン化18量体（配列番号30）にアニールした5' 蛍光標識23量体（配列番号29）を使用して15量体鋳型（配列番号31）を捕獲し、シーケンシン

グ反応から得たMALDI-TOF質量スペクトルを示す。

図48は慣用DNAシーケンサーを使用した以外は図47に示した反応から得られた同一産物のスタッキングフルオログラムを示す。

図49は実施例1に記載するようなサイクルシーケンサーを使用して鎖型として生物増幅産物と12量体(5'-TGC ACC TGA CTC-3' (配列番号34))シーケンシン

グプライマーから生成したシーケンシンググラダーのMALDI-TOF質量スペクトルを示す。脱プリンに起因するピークと配列に無関係なピークはアスタリスクを付けた。MALDI-TOF MS測定はリフレクトロンTOF MSで行なった。A) d d ATPで停止したシーケンシンググラダー; B) d d CTPで停止したシーケンシンググラダー; C) d d GTPで停止したシーケンシンググラダー; D) d d TTPで停止したシーケンシンググラダー。

図50はプライマーの後に40塩基までの対応計算分子量をもつ図49で生成したシーケンシンググラダーの模式図を示す。計算に使用した分子量は、プライマー-3581, 4Da、7-デアザ-d ATP 312, 2Da、d TTP 304, 2Da、d CTP 289, 2Da及び7-デアザ-d GTP 328, 2Daである。

図51はシーケンシング用鎖型として使用したβ-グロビン遺伝子内の増幅209bp増幅産物の配列を示す。適当な増幅プライマーの配列と12量体シーケンシングプライマーのロケーションも示す。この配列はプライマーから4塩基後の位置のホモ接合突然変異体を表す。野生型配列ではこのTはAで置換

される。

図52は実施例11に詳細に記載するようなA l u V p A多型性をもつインターフェロン-レセプター遺伝子のイントロン5の一部である配列を示す。スキームはd d GTP、d d CTP又はその両者を停止に使用したプライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)を示す。多型性検出プライマー(1FN)を下線で示し、停止ヌクレオチドを太字で示す。28人の無関係の個体と5人家族に存在する対

物の同時消化に基づく未知アポE遺伝子型の迅速同定スキームを示す。

図61はa) e 2/e 3、b) e 3/e 3、c) e 3/e 4及びd) e 4/e 4遺伝子型のマルチプレクス(コドン112及び158)質量スペクトルPROBE結果を示す。E: 伸長産物; P: 未伸長プライマー。上段: コドン112及び158領域、多型性部位は太字、プライマー配列は下線で示す。

図62はテロメラーゼ活性を検出するためのTRAPアッセイの質量スペクトルを示す(実施例13)。スペクトルはプライマーシグナルの2個を示し、5, 497, 3Da (計算値5523Da)に増幅産物TSプライマーと、7, 537, 6Da (計算値7, 537Da)にビオチン化b i o C Xプライマーのシグナルを示し、12, 755, 8Da (計算値12, 452Da)に3個のテロメア反復を含む第1のテロメラーゼ特異的アッセイ産物のシグナルを示し、アッセイ産物の質量はTaq DNAポリメラーゼのエキステンダーゼ活性により1d Aヌクレオチド分だけ(12, 765Da)大きい。

図63は図62の高質量範囲を示し、即ち12, 775, 6Daのピークはこれらのテロメア反復をもつ産物を表す。20, 322, 1Daのピークはテロメラーゼ活性の結果であり、7個のテロメア反復を形成している(1d Aヌクレオチド分の伸長を含む計算値20, 395Da)。1, 2, 3及び4で示したピークは14, 674Daの4個のテロメア反復と二次イオン産物を含む。

図64はヒトロシヒドロキシラーゼmRNAのRT増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトルを示し、神経芽細胞腫細胞の存在を示している(実施例14)。18, 763, 8Daのシグナルは入れ子増幅産物の非ビオチン化1本鎖61量体を表す(計算値18, 758, 2Da)。

図65(a)はRET癌遺伝子とd ATP、d CTP、d GTP及びd d TTPの混合物のPROBE反応の模式図である(実施例15)。Bはビオチンを表し、センス鎖型鎖はビオチンとストレプトアビジンを介して固体支持体に結合される。

図65(b)は野生型、C→T及びC→Aアンチセンス鎖のd d T及びd d A反応の予想PROBE産物を示す。

立遺伝子からの理論分子量を表す。全部ではないが大半の13単位対立遺伝子に存在する2種の第2の部位突然変異を示す。

図53は伸長サイクルPROBE反応産物沈殿から直接記録したMALDI-TOF-MSスペクトルを示す。インターフェロン-αレセプター遺伝子のイントロン5におけるA l u V p A多型性を使用した家族試験を示す(実施例11)。

図54は反応混合物中で停止ヌクレオチドとしてd d Cを使用したPROBE産物からの質量スペクトルを示す。母親と子供2のDNAからの約11650Daの分子量をもつ対立遺伝子は反復単位の1個に第2の部位突然変異が存在することを示唆している。

図55はターミネーターとしてp p p C d dを使用し、CFTR遺伝子のイントロン8の3'末端でポリトラクトの種々の対立遺伝子を検出するためのPROBE法の模式図を示す(実施例11)。

図56は伸長PROBE反応産物沈殿から直接記録したMALDI-TOF-MSスペクトルを示す。CFTR遺伝子のイントロン8の3'末端にポリトラクトの全3種の一般的対立遺伝子が出た。 (a) T5/T9ヘテロ接合、 (b) T7/T9ヘテロ接合(実施例11)。

図57はa) C f o l単独及びb) C f o lとR s a lを使用して実施例12に記載するように消化した252量体アポE遺伝子増幅産物(e 3/e 3遺伝子型)の質量スペクトルを示す。アスタリスク: 脱プリンピーク。

図58はC f o lで消化し、a) エタノール/グリコーゲンで1回、b) 同2回及びc) イソプロピルアルコール/グリコーゲンで2回沈殿することにより精製したアポE遺伝子増幅産物(e 3/e 3遺伝子型)の質量スペクトルを示す。

図59はa) e 2/e 3、b) e 3/e 3、c) e 3/e 4及びd) e 4/e 4遺伝子型からのC f o l/R s a l消化産

物の質量スペクトルを示す。診断フラグメントに点線を引いた。

図60は消化酵素C f o l及びR s a lによる252量体アポE遺伝子増幅産

物(図66は(a) 陰性対照、(b) ヘテロ接合患者1(Wt/C→T)及び(c) ヘテロ接合患者2(Wt/C→A)のPROBE産物質量スペクトルを示し、平均M_r値を報告する。

図67は(a) 野生型、(b) G→A、及び(c) G→Tホモ接合、(d) 野生型/G→A、(e) 野生型/G→T及び(f) G→A/G→Tヘテロ接合からのリボ開裂RET癌遺伝子増幅産物に相当する合成類似体のMALDI-FTMSスペクトルを示し、最も強い同位体ピークの質量を報告する。

図68は共有二官能性トリチルリンカーを介する核酸固定化の模式図である。

図69は疎水性トリチルリンカーを介する核酸固定化の模式図である。

図70は結合オリゴ(5'-イミノビオチン-TGCACCTGACTC、配列番号56)を含むマトリックス処理Dyna beadsの上清のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。マトリックスには内部標準(CTGTGGTCTGTCG、配列番号57)を加えた。

図71は結合オリゴ(5'-イミノビオチン-TGCACCTGACTC、配列番号56)を含むマトリックス処理Dyna beadsの上清のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。

図72はループプライマーオリゴ塩基伸長(ループPROBE)反応で実施する段階を模式的に示す。

図73AはステムループのC f o l消化後の上清のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。図73B-Dは種々の遺伝子型のMALDI-TOF質量スペクトルを示し、Hb Aは野生型遺伝子型(74B)、Hb Cは鎌状赤血球症を誘発するβ-グロビンのコドン6の突然変異(74C)、Hb Sは鎌状赤血球症を誘発するβ-グロビンのコドン6の別の突然変異(74D)である。

図74はCKR-5の増幅領域の核酸配列を示す。下線の配列は増幅プライマーに相同の領域に対応する。点線の領域は32bp欠失に対応する。

す。マトリックスには内部標準(CTGTGGTCTGTCG、配列番号57)を加えた。

図72はループプライマーオリゴ塩基伸長(ループPROBE)反応で実施する段階を模式的に示す。

図73AはステムループのC f o l消化後の上清のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。図73B-Dは種々の遺伝子型のMALDI-TOF質量スペクトルを示し、Hb Aは野生型遺伝子型(74B)、Hb Cは鎌状赤血球症を誘発するβ-グロビンのコドン6の突然変異(74C)、Hb Sは鎌状赤血球症を誘発するβ-グロビンのコドン6の別の突然変異(74D)である。

図74はCKR-5の増幅領域の核酸配列を示す。下線の配列は増幅プライマーに相同の領域に対応する。点線の領域は32bp欠失に対応する。

図75はセンスプライマー-c k r T7 f を用いた T7-RNAポリメラーゼの結合と分析しようとするCKR-5領域の増幅を助長するようにデザインし、24塩基のランダムに選択した配列から始まり、18塩基のT7プロモーターと19塩基のCKR-5に相同の配列を含む。

図76は後記実施例21に記載するように生成したCKR-5増幅産物のMALDI-TOF質量スペクトルである。

図77は選択したRNアーゼで消化した合成RNA25量体(5'-UCCG GUCUGAUGAGUCCGUGAGGAC-3'、配列番号62)の陽イオンUV-MALDI質量スペクトルである。合計約20 pmolのRNAを含む4.5 µlアッセイの0.6 µlアリコートと1.5 µlマトリックス(3-HPA)に固定して各酵素を分析した。5'末端を保存したフラグメントはRNアーゼによって異なる種類の矢印で示す(Hahnerら、Proceedings of the 44th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, p. 983 (1996))。

図78は合成RNA20量体の陽イオンUV-MALDI質量スペクトルによるRNアーゼC₁L₃及びクサチビンの特異性試験である。予想及び/又は実測開裂部位を矢印で示す。A、B、Cは正しい開裂部位と対応する単一開裂フラグメントを示す。開裂の不在は?で示し、非特異的开裂はXで示す。

図79はDNA分子(12量体、5'ビオチン化19量体、

22量体及び5'ビオチン化27量体)とストレプトアビジンをコートした磁性ビーズの混合物の分離を示す。a)マトリックス(3-HPA)1.5 µlと混合した各種約2~4 pmolを含む混合物0.6 µlの陽イオンUV-MALDI質量スペクトル。b)混合物を磁性ビーズとインキュベーション後に捕獲されたフラグメントを遊離させた以外はa)と同一のスペクトル。

図80はストレプトアビジンをコートした磁性ビーズからの固定化5'ビオチン化49 nt in vitro転写産物の溶解を示す。(a)磁性ビーズとイ

図84はcap-tag-2に結合した配列の質量スペクトルを示す。

図85は図82に示した方法に従い、ターミネーションにddATPを使用し1回のシーケンシング反応でβ-TAG1及びβ-TAG2プライマーを使用した後に分測することにより得られた質量スペクトルを示す。

図86は図82に示した方法に従い、ターミネーションにddCTPを使用し1回のシーケンシング反応でβ-TAG1及びβ-TAG2プライマーを使用した後に分測することにより得られた質量スペクトルを示す。

図87AはケモカインレセプターCKR-5遺伝子のフラグメントの野生型配列と増幅に使用したプライマー(太字)を示す。CKR-5対立遺伝子における32塩基対(bp)欠失を下線で示し、停止ヌクレオチドをイタリック体で示す。図87Bはアデノシンが付加された野生型鎖と付加されていない野生型鎖と、その長さや分子量を示す。図87Cは同じく32 bp

欠失を示す。図87Dは野生型遺伝子のPROBE産物を示し、図87Eは突然変異対立遺伝子のPROBE産物を示す。

図88は天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動(15%)及び銀染色により分析した種々の無関係個体の増幅産物を示す。野生型CKR-5に対応するバンドは75 bpに現れ、欠失をもつ遺伝子からのバンドは43 bpに現れている。75 bpよりも大きいバンドは非特異的増幅に起因する。

図89Aはヘテロ接合個体からのDNAのスペクトログラフを示し、質量23319 Daのピークは野生型CKR-5に対応し、質量13137 Da及び13451 Daのピークは夫々アデノシンが付加された欠失対立遺伝子と付加されていない欠失対立遺伝子に対応する。図89BはDNAをT4 DNAポリメラーゼで処理し、付加したアデノシンを除去した以外は図89Aと同一の個体から得たDNAのスペクトログラフを示す。図89C及び図89Dはホモ接合個体由来するスペクトログラフであり、図89Dではアデノシンを除去している。質量13000 Da未満の全ピークは多電荷分子に起因する。

図90Aはヘテロ接合個体から得たDNAで実施したPROBE反応の結果の質量スペクトルを示す。図90Bはホモ接合

インキュベーション前の転写産物の陽イオンUV-MALDI質量スペクトル。95%ホルムアミド単独(b)、10 mM EDTA(c)、10 mM CDTA(d)及び25%水酸化アンモニウム(e)の添加剤で溶解後の固定化RNA転写産物のスペクトル。EDTAとCDTAは25%水酸化アンモニウムでpH8に調整した。

図81はRNアーゼU₂で15分間消化後の5'ビオチン化49 nt in vitro転写産物の陽イオンUV-MALDI質量スペクトルを示す。a)ターゲットRNA約100 pmolを含む25 µlアッセイの分離前のスペクトル。b)磁

性ビーズに固定化した5'ビオチン化フラグメントの単離後のスペクトル。捕獲したフラグメントは10 mM CDTAを含む95%ホルムアミドの溶液で遊離させた。いずれの場合も試料の1 µlアリコートをマトリックス(3-HPA)1.5 µlと混合した。

図82はヒトβ-グロビン遺伝子のコドン5及び6とコドン30と、IVS-1供与部位における推定突然変異の並行検出を模式的に示す。図82Aはプライマーβ2及びβ11を使用したゲノムDNAの増幅を示す。プライマー及び固定タグのローケーションと野生型及び突然変異配列を示す。図82Bは(コドン5及び6の上流に結合する)プライマーβ-TAG1と(コドン30及びIVS-1供与部位の上流に結合する)β-TAG2を使用した単純なPrimer Reaction Oligo Base Extension (PROBE)における両部位の分析を示す。反応産物はストレプトアビジンをコートした常磁性粒子に結合したビオチン化捕獲プライマー(夫々cap-tag-1及びcap-tag-2)を使用して捕獲し、これらのプライマーは夫々β-TAG1及びβ-TAG2の5'末端に相補的な6個の5'末端塩基と、ユニバーサルプ

ライマーに結合する部分をもつ。

図83は図82に模式的に示したように分析した1個体からのDNA試料のPROBE産物の質量スペクトルを示す。

個体で実施したPROBE反応の結果の質量スペクトルを示す。夫々質量6604 Da及び6607 Daのピークは野生型対立遺伝子に対応し、質量6275 Daのピークは欠失対立遺伝子に対応する。プライマーは夫々質量5673 Da及び5676 Daに検出される。

図91は3個の異なる鎖型と5個の異なるPROBEプライマーを1回の反応で同時に使用する実施例24に記載するようなサーモサイクリングプライマーOligo Base Extension (tc-PROBE)反応のMALDI-TOF MSスペクトルを示す。

図92は実施例25に記載するようにp53遺伝子のエクソン5~8を増幅及び配列決定するためのシングルチューブプロセスを模式的に示す。質量スペクトルは図93のA反応である。

図93は実施例25に記載するようにp53遺伝子のエクソン7の一部を配列決定するための4回の別々の反応を重ねたプロットを示す。

図94は実施例25に記載するようにp53遺伝子のエクソン7の一部を配列決定するためにA反応から得られた質量スペクトルを示す。

図95は各反応産物5 nLをチップのウェルに移し、MALDI-TOFにより測定したp53シーケンシングラダーの質量スペクトルを示す。

図96Aは合成50量体(15.34 kDa)と27量体。(非相補的、8.30 kDa)の混合物のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。

図96Bは合成50量体(15.34 kDa)と27量体。(相補的、8.34 kDa)の混合物のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。各オリゴヌクレオチドの終濃度は10 µMとした。図96Bの23.68 kDaのシグナルはWC特異的dsDNAに対応する。

図97Aは図96と同様の試料調製を使用したアポリボタンパク質E遺伝子(ε3遺伝子型)のエクソン4の領域のCfoI/RsaI消化産物のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。

図97BはMALDI-TOF分析用試料を4℃で調製した以外は図97Aと同一のスペクトルを示す。

図98は、試料を4℃で調製したアポリボリ質E遺伝子（c4遺伝子型）のエクソン4の252塩基対領域のCf。

1/RsaI同時二重消化産物のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。

図99はピンツールマイクロディスペンサーを使用して診断産物の16エレメントアレイをMALDIターゲットに移すことにより15人の患者の小集団試験で得られた質量スペクトルを示す。

図100は合成20量体RNAのT₁消化後にサンプリングしたアリコートのMALDI質量スペクトルである。

発明の詳細な説明

定義

特に指定しない限り、本明細書中に使用する全科学技術用語は本発明の属する技術の当業者に一般に理解されている意味をもつ。許可されるならば、同時係属特許出願及び特許の各々の主題はその開示内容全体を本明細書の一部とする。

本明細書で使用する「生物試料」なる用語は任意生物源（例えばヒト、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルス）から得られる任意材料を意味する。本発明の目的では、生物試料は一般に核酸分子を含む。適当な生物試料の非限定的な例としては、固体材料（例えば組織、細胞ペレット、生検）と生物体

液（例えば尿、血液、唾液、羊膜液、敵液、脳髄液及び他の体液）が挙げられる。

本明細書で使用する「連鎖伸長ヌクレオチド」及び「連鎖停止ヌクレオチド」なる用語は当技術分野で理解されている意味で使用する。例えば、DNAでは連鎖伸長ヌクレオチドは2'-デオキシリボヌクレオチド（例えばdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）を含み、連鎖停止ヌクレオチドは2'、3'-ジデオキシリボヌクレオチド（例えばddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP）を含む。RNAでは連鎖伸長ヌクレオチドはリボヌクレオチド（例えばATP、CTP、GTP及びUTP）を含み、連鎖停止ヌクレオチドは3'-デオキシリボヌクレオチド（例えば3'-dA、3'-dC、3'-dG及び3'-dU）

Neck, NY及びノルウェー、オスロから市販されているストレプトアビジンをコートした磁性ビーズであるDYNABEADS等の官能化磁性ビーズを使用する）磁性相互作用；例えば2つの極性表面間又はオリゴ/ポリエチレングリコール間の「湿潤」会合等の極性相互作用；例えばアミド結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合等又は架橋剤を介する共有結合の形成；並びに酸-レベル又は光開裂性リンカーによる結合である。

2種の核酸配列に関して本明細書で使用する等価なる用語は、2種の該当配列が同一配列のアミノ酸又は等価タンパク質をコードすることを意味する。2種のタンパク質又はペプチドについて「等価」という場合には、2種のタンパク質又はペプチドがタンパク質又はペプチドの活性又は機能を実質的に変えない保存アミノ酸置換を除いて実質的に同一のアミノ酸配列をもつことを意味する。性質について「等価」という場合には、性質

が同程度まで存在する必要はない（例えば2種のペプチドは同一型の酵素活性を異なる程度で示してもよい）が、活性は実質的に同一であることが好ましい。2種のヌクレオチド配列に関して「相補的」という場合には、逆向きヌクレオチド間のミスマッチが好ましくは25%未満、より好ましくは15%未満、更に好ましくは5%未満、最も好ましくはゼロとなるように2種のヌクレオチド配列を相互にハイブリダイズできることを意味する。2種の分子は高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることが好ましい。

本明細書で使用するミスマッチ百分率を決定する際のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、当業者に理解される通りの条件であり、一般には、

- 1) 高ストリンジェンシー：0.1XSSPE, 0.1%SDS, 65℃、
- 2) 中ストリンジェンシー：0.2XSSPE, 0.1%SDS, 50℃、
- 3) 低ストリンジェンシー：1.0XSSPE, 0.1%SDS, 50℃に実質的に等価である。他の緩衝液、塩及び温度を使用しても等価ストリンジェンシーが得られるとみなされる。

本明細書で使用するプライマーとは、請求の範囲に記載する場合には固定化、

を含む。完全な1組の連鎖伸長ヌクレオチドとはdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを意味する。「ヌクレオチド」なる用語も当技術分野で周知である。

本明細書で使用するヌクレオチドはヌクレオシド、二及び三リン酸を含む。ヌクレオチドはホスホリチオエートヌクレオチドやデアザプリンヌクレオチド等の修飾ヌクレオチドも含む。完全な1組の連鎖伸長ヌクレオチドとはDNA鎖型を含む4種

の異なる塩基の各々にハイブリダイズすることが可能な4種の異なるヌクレオチドを意味する。

本明細書で使用する上添文字0～iは質量差を付けたi+1個のヌクレオチド、プライマー又はタグを表す。場合により、上添文字0は特定反応体の未修飾種を表し、上添文字iはこの反応体のi番目の質量改変種を表す。例えば2種以上の核酸を同時に検出したい場合には、i+1個の異なる質量改変デテクターオリゴヌクレオチド（D⁰、D¹、...、Dⁱ）を使用すると、マスペクトロメトリーにより質量改変デテクターオリゴヌクレオチド（D）の各種を相互に区別することができる。

本明細書で使用する「多重化」とは、（アレイの1スポットで）特定捕獲核酸フラグメント上の2個以上の分析物（例えば2個以上の（突然変異）遺伝子座）を同時に検出することを意味する。

本明細書で使用する「核酸」なる用語は、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）等の1本鎖及び/又は2本鎖ポリヌクレオチドと、RNA又はDNAの類似体又は誘導体を意味する。ペプチド核酸（PNA）、ホスホリチオエートDNA等の核酸の類似体や、他の同様の類似体及び誘導体も「核

酸」の用語に含まれる。

本明細書で使用する「結合」なる用語は、安定な結合、好ましくはイオン又は共有結合を意味する。好ましい結合手段はストレプトアビジン又はアビジンとビオチンの相互作用；疎水性相互作用；（例えばDynal, Inc. Great

バイブリダイジング、鎖置換、シーケンシングを必要とするマスペクトロメトリーに連したプライマーを意味する。核酸は十分に低分子量であり、一般に約70ヌクレオチド又は70未満であり且つマスペクトロメトリー検出に基づく本発明のマスペクトロメトリー法で有用であるために十分な寸法でなければならない。これらの方法は核酸の検出及びシーケンシング用プライマーを使用し、このようなプライマーは安定なデュプレックスを形成するために十分な数のヌクレオチド、一般に約6～30、好ましくは約10～25、より好ましくは約12～20のヌクレオチドを必要とする。従って、本発明の目的では、プライマーはプライマーの配列と用途に依って約6～70、より好ましくは12～70、より好ましくは約14～上限70までのヌクレオチド配列である。本発明のプライマーは、例えば突然変異分析に用いる場合には、診断に有用な遺伝子座の上流となるように選択し、目的部位まで又は目的部位を通るシーケンシングを使用して実施するときに、得られるフラグメントがマスペクトロメトリーにより検出するために十分であり且つ大き過ぎない質量をもつようにする。マス

スペクトロメトリー法では、5'末端に質量タグ又は修飾因子を付け、それ以外にはプライマーを標識しないことが好ましい。

本明細書で使用する核酸の「条件付け」なる用語は、ヌクレオチド単位当たり結合したカチオンの不均一性によるピーク広幅化をなくす目的で核酸分子のホスホジエステル主鎖を修飾（例えばカチオン交換）することを意味する。核酸分子をヨウ化アルキル、ヨードアセトアミド、β-ヨードエタノール又は2、3-エポキシ-1-プロパノール等のアルキル化剤と接触させると、核酸分子のモノチオホスホジエステル結合をホスホトリエステル結合に変換することができる。同様に、塩化トリアルキルシリルを使用してホスホジエステル結合を無電荷誘導体に変換してもよい。他の条件付け方法として、脱プリン（MS中の断片化）感受性を弱めるヌクレオチド（例えばN7-又はN9-デアザプリンヌクレオチド等のプリン類似体）やRNA構成ブロックを組み込んでもよいし、オリゴヌクレオチドトリエステルを使用してもよいし、アルキル化されるホスホリチオエート官能基を組み込んでもよいし、ペプチド核酸（PNA）等のオリゴヌクレオチ

D模擬体を使用してもよい。

本明細書で使用する支持体とは、本明細書に記載する材料に

応じて試料を付着する不溶性支持体を意味する。適当な支持体の例としてはビーズが挙げられ、例えばシリカゲル、CPG、磁性、アガロースゲル及び架橋デキストロース（即ちSephacrose及びSephadex）、セルロース及び固体支持体マトリックスとして利用できることが当業者に知られている他の材料からなる。例えば、支持体はシリカゲル、ガラス、磁性体、ポリスチレン/1%ジビニルベンゼン樹脂（例えばFmoc-アミノ酸-4-（ヒドロキシメチル）フェノキシメチルコポリ（スチレン-1%ジビニルベンゼン（DVD））樹脂であるWang樹脂、クロロトリチル（2-クロロトリチルクロロコポリスチレン-DVB樹脂）樹脂、Merrifield（クロロメチル化コポリスチレン-DVB）樹脂）、金属、プラスチック、セルロース、例えば商品名Sephadex（Pharmacia）で市販されているもの等の架橋デキストラン、例えば水素結合多量型アガロースゲルである商品名Sephacrose（Pharmacia）で市販されているもの等のアガロースゲル、並びに当業者に公知の他の同様の樹脂及び固相支持体の任意のもの又はその組み合わせから形成することができる。支持体マトリックスは任意の形状又は形態をとるこ

とができ、非限定的な例としては、キャピラリー、ガラス繊維フィルター、ガラス表面、金属表面（銅、金、銀、アルミニウム、銅及びケイ素）等の平坦支持体、多重ウェルプレート又は膜を含むプラスチック材料（例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオライド）、ピン（例えば組み合わせ合成又は分析に適したピンのアレー）、平坦表面のピットに形成したビーズ（例えばプレートをもつかもたないウェーハシリコン等のウェーハ）、及びビーズが挙げられる。

本明細書で使用する選択的に開裂可能なリンカーとは、選択条件下で開裂されるリンカーであり、例えば光開裂性リンカー、化学開裂性リンカー及び酵素開裂性リンカー（即ち制限エンドヌクレアーゼ部位又はリボヌクレオチド/RNアー

な固体支持体の例としてはビーズ（例えばシリカゲル、CPG、磁性、Sephadex/Sephacrose、セルロース）、キャピラリー、ガラス繊維フィルター、ガラス表面、金属表面（銅、金、銀、アルミニウム、銅及びケイ素）等の平坦支持体、多重ウェルプレート又は膜を含むプラスチック材料（例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオライド）、ピン（例えば組み合わせ合成又は分析に適したピンのアレー）、又は平坦表面のピットに形成したビーズ（例えばプレートをもつかもたないウェーハシリコン等のウェーハ）が挙げられる。

ターゲット核酸を含む試料は当業者に公知の種々の方法の任意のものにより固体支持体に移すことができる。例えば、核酸試料を支持体（例えばシリコンチップ）の各ウェルに手で又は

本明細書に記載するようなピンツールマイクロディスペンサー装置により移すことができる。あるいは、圧電ピペット装置を使用すると、ナノリットルオーダーの少量の試料を支持体に移すことができ、チップ上で高いスループット小型化診断性能が得られる。

固定化は例えば支持体に予め固定化しておいた捕獲核酸配列と、同様に検出しようとする核酸配列を含む核酸分子内に含まれる相補的核酸配列のハイブリダイゼーションを利用して実施することができる（図1A）。相補的核酸分子間のハイブリダイゼーションが支持体によって妨げられないようにするために、捕獲分子は例えば固体支持体と捕獲核酸配列間に少なくとも約5ヌクレオチド長のスペーサー領域を含むことができる。形成されるデュプレックスはレーザーパルスの作用下で開裂し、脱着を開始することができる。固体支持体に結合した核酸分子は、天然オリゴリボもしくはオリゴデオキシリボヌクレオチド及び類似体（例えばチオ修飾ホスホジエステル又はホスホトリエステル主鎖）を介して又は塩基配列を酵素分解しにくくするPNA類似体（例えばNielsenら、Science 254:1497（1991））等のオリゴヌクレオチド模擬体を使用

して捕獲塩基配列に結合することができる。

消化）である。リンカーは支持体に固定化DNAの間に挿入する。

核酸分子の単離

核酸分子は技術分野で周知の多数の方法の任意のものを使用して特定生物試料から単離することができ、特定生物試料に適合するように特定単離方法を選択する。例えば、固体支持体から核酸分子を得るためには凍結-融解及びアルカリ溶解法が有用であり、尿から核酸分子を得るためには熱及びアルカリ溶解

法が有用であり、血液から核酸を得るためにはプロテイナーゼK抽出を使用することができる（例えばRolfら（1994）PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer参照）。

マスペクトロメトリーを実施するのに十分な量の核酸分子を得るためには、増幅が必要である。本発明で使用するのに適した増幅法の例としては、クローニング（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（C. R. NewtonとS. Graham, PCR, BIOS Publishers, 1994）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えばWeidmannら（1994）PCR Methods Appl. Vol. 3, pp. 57-64; F. Barany（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:189-93参照）、鎖置換増幅（SDA）（例えばWalkerら（1994）Nucleic Acids Res. 22:2670-77参照）及び変法（例えばRT-PCR（例えば

Higuchiら（1993）Bio/Technology 11:1026-1030参照）、対立遺伝子特異的増幅（ASA）並びに転写に基づく方法が挙げられる。

核酸分子の固体支持体固定化

マスペクトロメトリー分析を容易にするためには、検出しようとする核酸配列を含む核酸分子を不溶性（即ち固体）支持体に固定化することができる。適当

リンカー

ターゲット検出部位はターゲット核酸分子（T）上の適当な官能基（L'）と捕獲分子上の適当な官能基（L）の可逆的又は不可逆的結合を介して固体支持体に直接結合することができる（図1B）。可逆的結合はマスペクトロメトリーの条件下で開裂されるように実施することができる（即ち比較的安定な有機基の間に電荷移動錯体又はレーベル結合等の光開裂性結合を形成する）。

光開裂性リンカーは光にあたり開裂し（例えばGoldmacherら（1992）Bioconj. Chem. 3:104-107参照）、光にあたりターゲット物質を放出するリンカーである。光にあたり開裂し、光にあたりターゲット物質を放出する光開裂性リンカーは公知である（例えばHazumら（1981）in Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K（編）、pp. 105-110はシステインの光開裂性保護基としてのニトロベンジル基の使用を記載しており、Yenら（1989）Makromol. Chem 190:69-82はヒドロキ

シプロビルメタクリルアミドコポリマー、グリシンコポリマー、フルオレセインコポリマー及びメチルローダミンコポリマーを含む水溶性光開裂性コポリマーを記載しており、Goldmacherら（1992）Bioconj. Chem. 3:104-107は近紫外線（350nm）を照射すると光分解する架橋剤を記載しており、Senterら（1985）Photochem. Photobiol 42:231-237は光開裂性結合を生じるニトロベンジルオキシカルボニルクロリド架橋剤を記載している）。好ましい態様では、マスペクトロメトリー中に開裂する光開裂性リンカー部分を使用して核酸を固定化する。本発明の好ましい光開裂性リンカーは実施例に記載する。

更に、L'を第4級アンモニウム基として結合を形成することができ、その場合には、固体支持体の表面が負電荷をもつようにし、負電荷をもつ核酸主鎖と反発し、マスペクトロメーターによる分析に必要な脱着を容易にすることが好ましい。脱着はレーザーパルスにより生じる熱により行ってもよいし、及び/又はL'に応じてL'発色団と共鳴するレーザーエネルギーの特異的吸収により行っ

てもよい。

従って、 $L-L'$ 化学は（例えばメルカプトエタノール又はジチオトレイトールにより化学的に開裂可能な）ある種のジスルフィド結合、ピオチン/ストレプトアビジン系、弱酸性条件下及びマススペクトロメトリー条件下で開裂可能なトリチルエーテル基のヘテロ二官能性誘導体（例えばKosterら（1990）“A Versatile Acid-Labile Linker for Modification of Synthetic Biomolecules,” *Tetrahedron Letters* 31:7095参照）、ヒドラジニウム/酢酸緩衝液を含むほぼ中性条件下で開裂可能なレプリニル基、トリプシン等のエンドペプチターゼ酵素により開裂可能なアルギニン-アルギニンもしくはリジン-リジン結合、ピロホスファターゼにより開裂可能なピロリン酸結合又は例えばリボヌクレアーゼもしくはアルカリにより開裂可能なオリゴデオキシヌクレオチド配列間のリボヌクレオチド結合であり得る。

官能基 L 及び L' は電荷移動錯体を形成し、一過性 $L-L'$ 結合を形成してもよい。多くの場合に「電荷移動結合」はUV/visスペクトロメトリーにより測定できる（例えばR.

Foster著Organic Charge Transfer Complexes, Academic Press, 1969参照）ので、電荷移動波長の対応エネルギーにレーザーエネルギーを同調させることができ、こうして固体支持体から特異的脱離を開始することができる。当業者に自明の通り、この目的には数種の組み合わせを利用することができ、供与官能基を固体支持体に付け、検出しようとする核酸分子に結合してもよいし、逆に検出しようとする核酸分子に供与官能基を付け、固体支持体に結合してもよい。

更に別のアプローチでは、比較的安定な基を均一に形成することにより可逆的 $L-L'$ 結合を形成してもよい。レーザーパルスの作用下でラジカル位置に（上記のような）脱離とイオン化を行なう。当業者に自明の通り、他の有機基を選択することもでき、これらの基の間の結合を均一に開裂するために必要な解離エネルギーを生じ、プライマーを固定化鎖にハイブリダイズする。

プライマー核酸を固体支持体に固定化し、ターゲット核酸をこれにハイブリダイズする態様では、開裂性リンカーを加えると、プライマーDNAを5'末端に固定化して遊離3'-OHを核酸合成（伸長）に使用することができ、ハイブリダイズした鎖型を変性により除去でき、伸長したDNA産物を固体支持体から開裂してMALDI-TOF MSを実施できるので、「ハイブリダイズした」ターゲットDNAの配列を決定することができる。3)でも同様に、固定化DNA鎖を鎖型にハイブリダイズして伸長させ、支持体から開裂することができる。こ

のように、ターゲット配列の不変領域に相補的な既知上流DNA配列の固定化プライマーを使用すると、Sangerシーケンシングと後述するプライマーオリゴ塩基伸長（PROBE）伸長反応を実施することができる。ヒトからの核酸を得、可変領域（遺伝素因もしくは疾患の原因となる欠失、挿入、ミスセンス突然変異、又はウイルス/細菌もしくは真菌DNAの存在）のDNA配列を検出するだけでなく、突然変異の実際の配列と位置も決定できる。

他の場合には、ターゲットDNAを固定化し、プライマーをアニールしなければならない。このためには、既知配列に基づいてより大きいDNAを増幅した後、固定化フラグメントをシーケンシングする必要がある（即ち伸長したフラグメントをハイブリダイズするが、上記のように支持体には固定化しない）。これらの場合には、MALDI-TOFスペクトルはハイブリダイズしたDNAのスペクトルであるため、リンカーを加えることは望ましくなく、固定化鎖型を開裂する必要がある。

本発明では核酸を固体支持体に固定化するためのリンカーとして当業者に公知の任意のリンカーを使用して核酸を固体支持体に結合することができる。本発明で好ましいリンカーは選択

的に開裂可能なリンカー、特に本明細書に例示するようなリンカーである。他のリンカーとしては、ビスマレイミドエトキシプロパン等の酸開裂性リンカーや、酸レービルトリチルリンカーが挙げられる。

ギーに応じて対応するレーザー波長を選択することができる（例えばC. Wenstrup著Reactive Molecules, John Wiley & Sons, 1984参照）。

PCR（図4）、LCR（図5）又は転写増幅（図6A）等の

増幅操作中に適当なプライマーを使用することにより、ターゲット捕獲配列（TCS）にアンカー基 L' を組み込んでもよい。

MALDI-TOF MSを使用してエキソヌクレアーゼシーケンシングを実施する場合には、その5'末端を介して固体支持体に固定化した1本鎖DNA分子を3'向きエキソヌクレアーゼで片側分解し、分解したヌクレオチドの分子量を順次測定する。逆Sangerシーケンシングにより固定化DNAのヌクレオチド配列が判明する。選択的に開裂可能なリンカーを加えることにより、遊離ヌクレオチドの質量を測定できるだけでなく、洗浄によりヌクレオチドを除去すると、固体支持体からDNAを開裂後にMALDI-TOFにより残留フラグメントの質量も測定することができる。本発明の光開裂性及び化学開裂性リンカー等の選択的に開裂可能なリンカーを使用すると、MALDI-TOFのイオン化及び揮発段階中にこの開裂が生じるように選択的にすることができる。デュプレックスに分解される2本鎖DNAの5'固定化鎖についても同じことが言える。また、5'向きエキソヌクレアーゼを使用し、3'末端を介してDNAを固体支持体に固定化する場合も同様である。

本発明では少なくとも次の3種の固定化態様が考えられる。

1) ターゲット核酸を増幅又は獲得する（プライマーを増幅又は単離させるためにターゲット配列又は両鎖DNA配列は分かっている必要はない）。2) プライマー核酸を固体支持体に固定化し、ターゲット核酸をこれにハイブリダイズする（これは試料中のターゲット配列の存在を検出するため又は配列決定するために行う）。3) （増幅又は単離した）2本鎖DNAを所定の鎖との結合を介して固定化し、デュプレックスを除去するようにDNAを変性した後、ターゲット部位の上流に相同部分をもつ高濃度の相補的プライマー又はDNAを加えて鎖置換

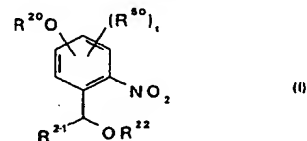
特にターゲット物質を反応させ易くするように開裂する必要がある場合には、酸開裂性リンカー、光開裂性リンカー及び感熱性リンカーも使用できる。酸開裂性リンカーの非限定的な例としてはビスマレイミドエトキシプロパン、アジピン酸ジヒドラジドリンカー（例えばFattomら（1992）*Infection & Immunity*, 60:584-589参照）及び細胞内トランスフェリン循環経路に入るために十分なトランスフェリン部分を含む酸レービルトランスフェリン結合体（例えばWelshonerら（1991）*J. Biol. Chem.*, 266:4309-4314参照）が挙げられる。

光開裂性リンカー

本発明は光開裂性リンカーを提供する。特に、オリゴヌクレオチドの固相合成に用いるそのホスホロアミダイト誘導体としての光開裂性リンカーを提供する。リンカーは α -ニトロベンジル部分とリン酸結合を含み、UV照射すると数分以内に結合

体を完全に光開裂することができる。使用するUV波長は照射がオリゴヌクレオチドを損傷しないように選択され、好ましくは約350~380nm、より好ましくは365nmである。本発明の光開裂性リンカーは一般に使用されているホスホロアミダイトモノマー（Sinhaら（1983）*Tetrahedron Lett.* 24:5843-5846; Sinhaら（1984）*Nucleic Acids Res.* 12:4539-4557; Beaucageら（1993）*Tetrahedron* 49:6123-6194; 及びMatteucciら（1981）*J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191参照）と同等の結合効率をもつ。

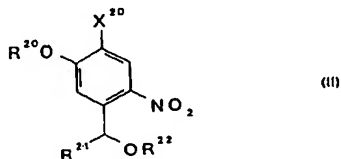
1態様において、光開裂性リンカーは式I:



〔式中、 R^{20} は ω -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル又は ω -ヒドロキシアルキルであり、 R^{21} は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカル

ルボニル及びカルボキシから選択され、 R^{22} は水素又は(ジアルキルアミノ)(ω -シアノアルコキシ)P-であり、 t は0~3であり、 R^{30} はアルキル、アルコキシ、アリール又はアリールオキシである]をもつ。

好ましい態様において、光開裂性リンカーは式I I I:



〔式中、 R^{20} は ω -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル、 ω -ヒドロキシアルキル又はアルキルであり、 R^{21} は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル及びカルボキシから選択され、 R^{22} は水素又は(ジアルキルアミノ)(ω -シアノアルコキシ)P-であり、 X^{20} は水素、アルキル又はOR 20 である]をもつ。

特に好ましい態様において、 R^{20} は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル、3-ヒドロキシプロピル又はメチルであり、 R^{21} は水素、メチル及びカルボキシから選択さ

れ、 R^{22} は水素又は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 X^{20} は水素、メチル又はOR 20 である。より好ましい態様において、 R^{20} は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルであり、 R^{21} はメチルであり、 R^{22} は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 X^{20} は水素である。別のより好ましい態様において、 R^{20} はメチルであり、 R^{21} はメチルであり、 R^{22} は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-で

より好ましい態様において、 R^{23} は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 r 及び s は0であり、 R^{24} は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシ、4-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ブチル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル、2-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)エチル、1-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-プロピル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから選択される。 R^{24} は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシが最も好ましい。

光開裂性リンカーの製造

A. 式I又はI Iの光開裂性リンカーの製造

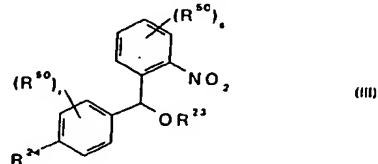
式I又はI Iの光開裂性リンカーは下記方法により製造することもできるし、適当な出発材料を選択することにより下記方法を多少変更するか又は当業者に公知の他の任意の方法により製造することもできる。式I Iの光開裂性リンカーの詳細な合成手順は実施例に記載する。

X^{20} が水素である式I Iの光開裂性リンカーでは、リンカーは次のように製造することができる。5-ヒドロキシ-2-ニ

トロベンズアルデヒドをハロゲン化 ω -ヒドロキシアルキル(例えば臭化3-ヒドロキシプロピル)でアルキル化した後、得られたアルコールを例えばシリルエーテルで保護すると、5-(ω -シリルオキシアルコキシ)-2-ニトロベンズアルデヒドが得られる。アルデヒドに有機金属を加えると、ベンジルアルコールが得られる。使用可能な有機金属としては、(R^{21} がアルキルであるリンカーの場合には)トリメチルアルミニウム等のトリアルキルアルミニウム、(R^{21} が水素であるリンカーの場合には)ホウ水素化ナトリウム等のホウ水素化物、又は(R^{21} がカルボキシ又はアルコキシカルボニルであるリンカーの場合には)シアン化カリウム等のシアン化金属が挙げられる。シアン化金属の場合には、その後、反応生成物であるシアノヒドリンを水又はアルコールの存在下に酸性又は塩基性条件下で加水分解すると、目的化合物が得られる。

あり、 X^{20} は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシである。

別の態様において、光開裂性リンカーは式I I I:



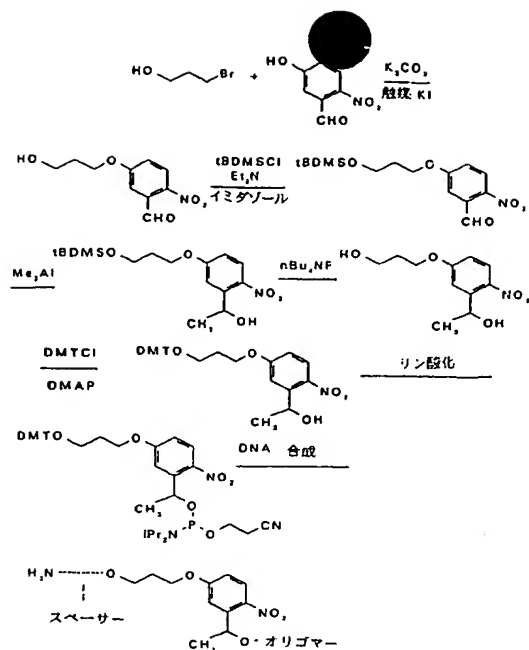
〔式中、 R^{23} は水素又は(ジアルキルアミノ)(ω -シアノアルコキシ)P-であり、 R^{24} は ω -ヒドロキシアルコキシ、 ω -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルコキシ、 ω -ヒドロキシアルキル及び ω -(4, 4'-ジメトキシトリチル

オキシ)アルキルから選択され、アルキル又はアルコキシ鎖上で1個以上のアルキル基により置換されていてもいなくてもよく、 r 及び s は各々独立して0~4であり、 R^{50} はアルキル、アルコキシ、アリール又はアリールオキシである]をもつ。所定の態様において、 R^{24} は ω -ヒドロキシアルキル又は ω -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルであり、アルキル鎖上でメチル基により置換されている。

好ましい態様において、 R^{23} は水素又は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 R^{24} は3-ヒドロキシプロポキシ、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシ、4-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシ-1-プロピル、1-ヒドロキシ-2-プロピル、3-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル、2-ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、4-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ブチル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-1-プロピル、2-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)エチル、1-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-プロピル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから選択される。

その後、例えばフッ化テトラブチルアンモニウムで脱シリル化して対応するアルコールを得た後、塩化4, 4'-ジメトキシトリチルと反応させることにより、得られたベンジルアルコールの側鎖のシリル基を4, 4'-ジメトキシトリチル基に交換する。例えば2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホリタミドと反応させると、 R^{22} が(ジアルキルアミノ)

式I Iの光開裂性リンカーの特定合成例を下記スキームに示し、オリゴヌクレオチド合成におけるリンカーの使用も示す。このスキームは単に例示の目的に過ぎず、本発明の範囲を制限するものではない。これらの合成変換の実験の詳細は実施例に記載する。



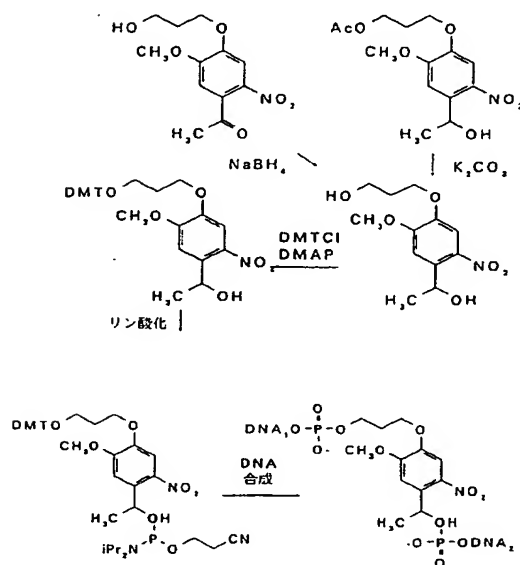
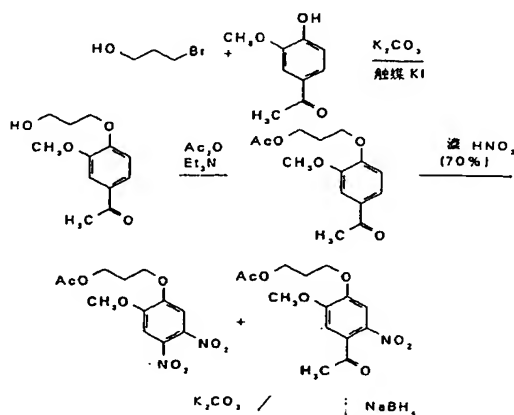
X²⁰がOR²⁰である式Iのリンカーの合成では、例えば炭酸カリウム及び塩化シリルとの反応により3, 4-ジヒドロキシアセトフェノンの4-ヒドロキシを選択的に保護する。アセトフェノンの代わりに安息香酸エステル、プロピオフェノン、ブチロフェノン等を使用してもよい。得られた4-シリルオキシ-3-ヒドロキシアセトフェノンを次に(R²⁰がアルキルであるリンカーの場合には)ハロゲン化アルキルで3-ヒドロキシルをアルキル化し、例えばフッ化テトラブチルアンモニウムで脱シリル化すると、3-アルコキシ-4-ヒドロキシアセトフェノンが得られる。この化合物を次にハロゲン化ω-ヒドロキシアシル(例

えば臭化3-ヒドロキシプロピル)と反応させて4-ヒドロキシルをアルキル化すると、4-(ω-ヒドロキシアシルコキシ)-3-アルコキシアセトフェノンが得られる。次に側鎖アルコールをエステル(例えば酢酸エステル)として保護する。次にこの化合物の5位を例えば濃硝酸で硝酸化すると、対応する2-ニトロアセトフェノンが得られる。順序はどちらでもよいが、側鎖エステルを例えば炭酸カリウムで脱化し、ケトン例えばホウ水素化ナトリウムで還元すると、2-ニト

ロ-4-(ω-ヒドロキシアシルコキシ)-5-アルコキシベンジルアルコールが得られる。

次に塩化4, 4'-ジメトキシトリチルと反応させることにより側鎖アルコールを対応する4, 4'-ジメトキシトリチルエーテルとして選択的に保護する。更に例えば2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホリタミドと反応させると、R²²が(ジアルキルアミノ)(ω-シアノアルコキシ)Pであるリンカーが得られる。

式Iの光開裂性リンカーの特定合成例を下記スキームに示す。このスキームは単に例示の目的に過ぎず、本発明の範囲を制限するものではない。変換の詳細な実験手順は実施例に記載する。



B. 式Iの光開裂性リンカーの製造

式Iの光開裂性リンカーは下記方法により製造することもできるし、適当な出発材料を選択することにより下記方法を多少変更するか又は当業者に公知の他の方法により製造することもできる。

一般に、式Iの光開裂性リンカーはω-ヒドロキシアシル又はアルコキシアリール化合物、特にω-ヒドロキシアシル又はアルコキシベンゼンから製造される。これらの化合物は市販されているが、ハロゲン化ω-ヒドロキシアシル(例えば臭化3-ヒドロキシプロピル)とフェニルリチウム(ω-ヒドロキシアシルベンゼンの場合)又はフェノール(ω-ヒドロキシアシルコキシベンゼンの場合)から製造することもできる。ω-ヒドロキシル基を(例えば酢酸エス

テルとして)アシル化した後、塩化2-ニトロベンゾイルで芳香族環をフリーデルクラフツアシル化すると、4-(ω -アセトキシアルキル又はアルコキシ)-2-ニトロベンゾフェノンが得られる。順序はどちらでもよいが、ケトン例えばホウ水素化ナトリウムで還元し、側鎖エステルを酸化する、2-ニトロフェニル-4-(ヒドロキシアルキル又はアルコキシ)フェニルメタン-

ルが得られる。塩化4, 4'-ジメトキシトリチルと反応させることにより、末端ヒドロキシ基を対応する4, 4'-ジメトキシトリチルエーテルとして保護する。その後、ベンジルヒドロキシ基を例えば2-シアノエチルジソプロピルクロロホスホアミダイトと反応させると、R²³が(ジアルキルアミノ)(ω -シアノアルコキシ)P-である式Iのリンカーが得られる。

式Iの他の光開裂性リンカーは上記合成で ω -ヒドロキシアルキル又はアルコキシベンゼンを2-フェニル-1-プロパノール又は2-フェニルメチル-1-プロパノールに置き換えることにより製造することができる。これらの化合物は市販されているが、例えば触媒第1銅イオンの存在下に臭化フェニルマグネシウム又は臭化ベンジルマグネシウムを必要なオキシラン(即ちプロピレンオキシド)と反応させることにより製造することもできる。

化学開裂性リンカー

種々の化学開裂性リンカーを使用して固定化核酸と固体支持体の間に開裂性結合を導入することができる。酸レーベル結合は3-HPAマトリックス溶液を加えると核酸の条件付け中に

開裂されるので、マスマスペクトロメトリー、特にMALDI-TOF MSに好ましい本発明の化学開裂性リンカーは酸レーベルリンカーである。酸レーベル結合は別個のリンカー基(例えば酸レーベルトリチル基、図68、実施例16参照)として導入してもよいし、ジソブピルシリルを使用して1個以上のシリルヌクレオシド同様に導入することにより合成核酸リンカーに組み込み、ジソブピルシリルに結合したオリゴヌクレオチド類似体を形成してもよい。ジソブピルシリルはDNA主鎖中のホスホジエステル結合に置換し、1.5%トリフルオ

を使用することにより並行処理を実施することが有用な場合もある。「多重化」は数種の異なる方法により実施することができる。例えば、対応するデテクター(プローブ)分子(例えばオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド模擬体)を使用することにより1個のターゲット配列上で数個の突然変異を同時に検出することができる。デテクターオリゴヌクレオチドD1、D2及びD3間の分子量差は同時検出(多重化)を可能にするために十分大きくなければならない。これは配列自体(組成又は長さ)によっても得られるし、質量改変官能基M1~M3をデテクターオリゴヌクレオチドに導入しても得られる(図2参照)。

核酸の質量改変

例えばオリゴヌクレオチドの5'末端(M¹)、ヌクレオ塩基

(又は塩基)(M², M³)、リン酸主鎖(M⁴)及びヌクレオシドの2'位(M⁴, M⁵)及び/又は末端3'位(M⁵)に質量改変部分を結合することができる。質量改変部分の例としては例えばハロゲン、アジド又はXR型(式中、Xは結合基であり、Rは質量改変官能基である)のものが挙げられる。こうして、質量改変官能基を使用してオリゴヌクレオチド分子に規定質量増分を導入することができる。

質量改変官能基はヌクレオチド分子内の種々の位置に配置することができる(例えば米国特許第5,547,835号及び国際PCT出願第WO94/21822号参照)。例えば、質量改変部分Mはヌクレオ塩基M²(c⁷-デアザヌクレオシドの場合にはC-7、M³にも)、三リン酸基の α リン酸M⁴又はヌクレオシド三リン酸の糖環の2'位M⁴及びM⁵に結合することができる。例えば α -チオヌクレオシド三リン酸等でホスホジエステル結合(M⁴)に修飾を加えると、これらの修飾は正しいワトソン-クリック塩基対合を妨げずに例えばアルキル化反応により完全な核酸分子の1段階合成後部位特異的修飾が得られるという利点がある(例えばNakamayeら(1988)Nucl. Acids Res. 16:9947-59参照)。

特に好ましい質量改変官能基は、ポリメラーゼにより核酸に良好に組み込まれる

ロ酢酸(TFA)又は3-HPA/4%TFA MALDI-TOFマトリックス溶液等の弱酸性条件下でDNA分子に1個以上の鎖内切断を導入する。ジソブピルシリルに結合したオリゴヌクレオチド前駆物質及び類似体の製造方法は当業者に公知である(例えばSahaら(1993)J. Org. Chem. 58:7827-7831参照)。これらのオリゴヌクレオチド類似体は、ジソブピルシリルに結合したデオキシリボヌクレオチドを使用するソリッドステートオリゴヌクレオチド合成法により容易に製造することができる。

核酸条件付け

マスマスペクトロメトリー分析の前に例えば揮発に必要なレーザーエネルギーを低減するため及び/又は断片化を最小にするために核酸分子を「条件付け」すると有用であり得る。条件付けはターゲット検出部位を固定化している間に実施することが好ましい。条件付けの1例は核酸分子のホスホジエステル主鎖の修飾(例えばカチオン交換)であり、ヌクレオチド単位当たりに結合するカチオンの不均一性によるピーク広幅化をなくすのに有用であり得る。核酸分子をヨウ化アルキル、ヨードアセトアミド、 β -ヨードエタノール又は2,3-エポキシ-1-プロパノール等のアルキル化剤と接触させると、核酸分子のモノチオホスホジエステル結合をホスホトリエステル結合に変換することができる。同様に、塩化トリアルキルシリルを使用してホスホジエステル結合を無電荷誘導体に変換してもよい。他の条件付け方法として、脱プリン(MS中の断片化)感受性を弱めるヌクレオチド(例えばN7-又はN9-デアザプリンヌクレオチド等のプリン類似体)やRNA構成ブロックを組み込んでもよいし、オリゴヌクレオチドトリエステルを使用してもよいし、アルキル化されるホスホロチオエート官能基を組み込

んでもよいし、PNA等のオリゴヌクレオチド模擬体を使用してもよい。

多重反応

用途によっては、(アレーの1スポットで)特定捕獲核酸フラグメント上の2個以上の(突然変異)遺伝子座を同時に検出することが有用な場合や、あるいは種々の固体支持体上のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド模擬体アレー

という理由からホウ素修飾核酸である(例えばPorterら(1995)Biochemistry 34:11963-11969; Hasanら(1996)Nucleic Acids Res. 24:2150-2157; Liら(1995)Nucl. Acids Res. 23:4495-4501参照)。

更に、例えばヌクレオシド三リン酸の糖環の3'位M⁵に結合することにより連鎖停止を変化させるように質量改変官能基を加えることもできる。当業者に自明の通り、本発明の方法では多数の組み合わせを使用することができる。同様に当業者に自明の通り、連鎖延長ヌクレオシド三リン酸を同様に質量改変することもでき、官能基及び結合位置については多数の変形及び組み合わせが可能である。

特定理論の裏付けはないが、XRのRにオリゴ/ポリエチレングリコール誘導体を使用して質量改変Mを導入することもできる。この場合の質量改変増分は4であり、即ちmを0から4に変え、核酸分子(例えば夫々デテクターオリゴヌクレオチド(D)又はヌクレオシド三リン酸(図6(C)))に質量単

位45(m=0)、89(m=1)、133(m=2)、177(m=3)及び221(m=4)を加えるだけで5種の異なる質量改変種を生成することができる。オリゴ/ポリエチレングリコールはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、 t -ブチル等の低級アルキルでモノアルキル化することもできる。選択結合基Xについても例示する。他の化学を質量改変化合物で使用することもできる(例えばOligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, F. Eckstein編, IRL Press, Oxford, 1991に記載の化学参照)。

更に別の態様では、オリゴ/ポリエチレングリコール以外の種々の質量改変官能基Rを選択し、適当な結合化学Xを介して結合することができる。単純な質量改変はF、Cl、Br及び/又はI等のハロゲン又はCN、SCN、NCS等の擬ハロゲンをHに置換するか、あるいは種々のアルキル、アリールもしくはアラキル部分(例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、 t -ブチル、ヘ

キシル、フェニル、置換フェニル、ベンジル、官能基（例えば CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $\text{Si}(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)$ 、 $\text{Si}(\text{CH}_3)$

$(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ 、 $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$) を使用することにより得られる。更に別の質量変化は核酸分子（例えばデテクター (D)）又はヌクレオシド三リン酸を介してホモ又はヘテロペプチドを結合することにより得られる。質量増分57の質量変化種を生成するのに有用な1例はオリゴグリシンの結合であり、例えば74 ($r=1$, $m=0$)、131 ($r=1$, $m=1$)、188 ($r=1$, $m=1$)、245 ($r=1$, $m=3$) の質量変化が得られる。単純なオリゴアミドを使用することもでき、例えば74 ($r=1$, $m=0$)、88 ($r=2$, $m=0$)、102 ($r=3$, $m=0$)、116 ($r=4$, $m=0$) 等の質量変化が得られる。本明細書に記載するもの以外に種々の変形が当業者に自明である。

種々の質量変化デテクターオリゴヌクレオチドを使用して可能な全変異体/突然変異体を同時に検出することができる（図6B）。あるいは、伸長及び停止ヌクレオシド三リン酸の組み合わせを変えてDNA/RNAポリメラーゼ用プライマーとして機能するようにデテクターオリゴヌクレオチドをデザイン及び配置することにより、1個の突然変異の部位で全4種の塩基を検出することができる（図6C）。例えば、増幅プロセス中

に質量変化を組み込んでよい。

図3は平坦表面（例えば「チップアレイ」）に位置特異的に固定化した種々の特定捕獲配列を使用することにより区別する別の多重検出フォーマットを示す。異なるターゲット配列T1〜Tnが存在する場合には、それらのターゲット捕獲部位TCS1〜TCSnは相補的固定化捕獲配列C1〜Cnと特異的に相互作用する。質量変異官能基M1〜Mnにより適当に質量差をつけたデテクターオリゴヌクレオチドD1〜Dnを使用することにより検出する。

マスマスベクトロメトリーによるDNAシーケンシング法

本発明で利用可能なマスマスベクトロメトリーフォーマットとしては、マトリックス助成レーザーデソープションイオン化 (MALDI)、エレクトロスプレー

バイオマス走査

実施例33に記載するこの態様では、2本の1本鎖核酸を固体支持体に各々固定化する。一方の支持体は野生型配列をコードする核酸を含み、他方の支持体は突然変異ターゲット配列をコードする核酸を含む。完全ヒトゲノムDNAを1種以上の制限エンドヌクレアーゼ酵素で消化すると、2本鎖ゲノムDNAの小さいフラグメント（10〜1,000bp）が生成される。消化したDNAを固定化1本鎖核酸と共にインキュベートし、試料を加熱してDNAデュプレックスを究性させる。固定化核酸は相補的DNA鎖に関して他のゲノムDNA鎖と競合し、適当

な条件下で相補的DNA鎖の一部は固定化核酸とハイブリダイズし、鎖置換を生じる。高ストリンジェンシー洗浄条件を使用することにより、固定化核酸とゲノムDNA鎖の間に厳密な一致が存在する場合のみ2種の核酸はDNAデュプレックスとして残存する。固定化核酸にハイブリダイズした状態のDNAをマスマスベクトロメトリーにより分析し、質量スペクトル中で適当な質量のシグナルを検出し、野生型対立遺伝子であるか突然変異対立遺伝子であるかを診断する。こうして生物試料から完全ゲノムDNAを単離し、所定の突然変異の有無をスクリーニングすることができる。種々の1本鎖核酸をアレイフォーマットとして固定化することにより、多数の遺伝子座について一連の突然変異を同時にスクリーニングすることができる（即ち多重化）。

更に、低ストリンジェンシー洗浄条件を使用すると、ハイブリダイズしたDNA鎖について、ターゲット制限エンドヌクレアーゼフラグメント内の欠失又は挿入に起因する質量変化をマスマスベクトロメトリーにより分析することができる。

プライマーオリゴヌクレオチド塩基伸長

後記実施例11に記載するように、プライマーオリゴ塩基伸

長 (PROBE) 法をマスマスベクトロメトリーと組み合わせると、シーケンシングによって検出することしかできない反復単位の厳密な数（即ち均一配列内のヌクレオチドの数）と多型性領域内の第2の部位突然変異を検出することができる

(ESI)（例えば連続又はバッチ等のイオン化 (I) 技術と関連技術（例えばイオンスプレー、サーモスプレー、高速原子衝突）及び質量クラスター衝撃 (MC I) が挙げられ、これらのイオン源はインリニアフィールド飛行時間 (TOF)、単一又は多重四重極型、単一又は多重磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FTICR)、イオントラップ又はこれらを組み合わせ

たハイブリッドデテクター（例えばイオントラップ飛行時間）等の検出フォーマットに適合させることができる。イオン化には凍結分析調製物 (MALDI) 又は溶剤組み合わせ (ESI) 等の多数のマトリックス/波長組み合わせを使用することができる。

正常DNA分子は4種のヌクレオチド単位 (A、T、C、G) を含み、これらの各々の質量は固有である（夫々モノ同位体質量313.06、304.05、289.05、329.05 Da）ので、正確な質量測定によりそのDNAの可能な塩基組成を規定又は限定することができる。各単位分子量は4900 Daを超えないと少なくとも1種の許容組成をもたず、全5量体のうちで非固有の公称分子量は1種しかないか、8量体では20種ある。これら以上のオリゴヌクレオチドでは、このような質量オーバーラップは高分解能FTICR MSで得られる $\sim 1/10^5$ (~ 10 ppm) 質量精度で分解することができる。25量体AsT₂₀では、 ± 0.5 Daで測定すると組成縮重は20であるが、2 ppm精度で測定すると3 (AsT₂₀、T₄C₁₂G₉、A₁₃C₄G₁₈) まで減る。所定の組成限定（例えば鎖中の4種の塩基のうちの1種の有無）により、更にこれを

減らすことができる（下記参照）。

非限定的な例としてカーブフィールドドリフレクトロン又は遠征抽出飛行時間MS装置等の中分解能装置を使用してもシーケンシング又は診断用DNA検出を改善することができる。これらの装置はいずれも例えばプライマーオリゴ塩基伸長 (PROBE) 又は競合的オリゴヌクレオチド塩基伸長 (COSBE)、シーケンシング又は小さい増幅産物の直接検出から生成される ≥ 30 量体鎖で9 Da (Δm (A-T)) シフトを検出することが可能である。

このように、PROBE法は別個のゲノム部位における検出可能な対立遺伝子の合計数を増し、多型性情報含有量 (PIC) を増し、例えば父親確定又は法廷用途の統計分析に著しく確実な検証が可能になる。

この方法はデオキシNTPとデオキシ形で存在しないジデオキシNTPの混合物の存在下にDNAポリメラーゼを使用して可変ヌクレオチドタンデム反復 (VNTR) 又は多型性モノヌクレオチド配列に隣接してアニールする検出プライマーの伸長に基づく。DNAを標識せずに、得られる産物をMALDI-TOFマスマスベクトロメトリーにより評価及び分解する。28人の無関係個体による模擬日常適用によると、外部校正を使用したこの方法の質量誤差は最悪の場合で0.83% (56量体) であり、これは約0.1塩基の精度に匹敵し、日常標準質量偏差は0.1% (0.03塩基) の範囲である。慣用電気泳動法でこのような精度に達するのは非現実的であり、法医学及び父

親確定試験におけるPROBEとマスマスベクトロメトリーの価値は明白である。

フーリエ変換マスマスベクトロメトリーは分解能が非常に高いので、4本のチューブから塩基を計数する代わりに質量差から配列を解読できるため、Sanger又はMaxam-Gilbertシーケンシング実験の全反応を同時に測定することができる。

更に、エキソヌクレアーゼによる段階的片側分解により生じる隣接塩基間の質量差を利用して、生成されるフラグメントの完全な配列を解読することができる。エキソヌクレアーゼ酵素が相次々出るときに生成されるヌクレオシド/ヌクレオチド混合物はUV又は蛍光測定により区別されないが、dA、dT、dG及びdCの分子量を区別する分解能が著しく高いのでマスマスベクトロメトリーには問題ない。隣接塩基（即ちヌクレオチド）の質量は例えば高速原子衝突 (FAB) 又はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) マスマスベクトロメトリーを使用して測定することができる。

後記実施例4及び12に詳細に記載するようにエンドヌクレアーゼ消化で生成される質量のシフトしたフラグメントを探索

突然変異／多型性検出試験

| 臨床問題 | 遺伝子 | 突然変異／多型性 |
|--------------------|-----------------------------|--|
| 囊性線維症 | CFTR | 14 エキソン／イントロンにおける38 の疾病誘発突然変異 |
| 心臓病 (コレステロール代謝) | アポ E アポ A-IV アポ B-100 | 112R, 112C, 158R, 158C 347S, 347T, 360H, 360Q 3500Q, 3500R |
| 甲状腺癌 | RET 癌原遺伝子 | C634W, C634T, C634R, C634S, C634F |
| 鎌状赤血球症／ タラセミア | β-グロビン | 鎌状赤血球症 S 及び C45 の タラセミア対立遺伝子 |
| HIV 感受性 | CCR-5 | 32bp 欠失 |
| 乳癌感受性 | BRCA-2 | エキソン 2 の 2bp (AG) 欠失 |
| 血栓症 | 第 V 因子 | R506Q |
| 動脈硬化症 | GpIIb/IIIa E-セレクトリン | L32P S128R |
| 高血圧 | ACE | I/D 多型性 |

突然変異の検出

遺伝病の診断

上記マスマススペクトロメトリ法を使用して例えば現在知られている3000種を超える遺伝病(例えば血友病、タラセミア、デュシェン筋ジストロフィー(DMD)、ハンチントン病(HD)、アルツハイマー病及び嚕胎性線維症(CF)の任意のものを診断又は同定することができる。

後記実施例3は、野生型CFTR遺伝子と3塩基対(900ダルトン)しか相違しない嚕胎性線維症膜貫通伝導調節遺伝子(CFTR)の突然変異(ΔF50

8)のマスマススペクトロメトリ検出法について記載する。実施例3に詳述するように、検出は正常又は突然変異対立遺伝子に相補的な3'末端塩基をもつ1対のプライマーを使用するシングルチューブ競合的オリゴヌクレオチド塩基伸長(COSBE)反応を利用する。ポリメラーゼと1塩基上流のヌクレオチド三リン酸をハイブリダイゼーション及び付加すると、正しくアニールした(即ち3'末端ミスマッチのない)プライマーのみが伸長し、分子量シフトにより産物を分解し、マトリックス介助レーザーデソープションイオン化飛行時間マスマススペクトロメトリにより測定する。

8)のマスマススペクトロメトリ検出法について記載する。実施例3に詳述するように、検出は正常又は突然変異対立遺伝子に相補的な3'末端塩基をもつ1対のプライマーを使用するシングルチューブ競合的オリゴヌクレオチド塩基伸長(COSBE)反応を利用する。ポリメラーゼと1塩基上流のヌクレオチド三リン酸をハイブリダイゼーション及び付加すると、正しくアニールした(即ち3'末端ミスマッチのない)プライマーのみが伸長し、分子量シフトにより産物を分解し、マトリックス介助レーザーデソープションイオン化飛行時間マスマススペクトロメトリにより測定する。

嚕胎性線維症ΔF508多型性では、28量体「正常」(N)及び30量体「突然変異」(M)プライマーから夫々N及びMホモ接合とヘテロ接合の29及び31量体が生成される。プライマーと産物の分子量は比較的小さく(<10kDa)、これらの質量差は少なくとも1~300Daヌクレオチド単位であるので、このような測定には低分解能装置が適している。

実施例11に詳述するようなサーモシーケンスサイクルシーケンシングも遺伝病の検出に有用である。

遺伝病の原因となる遺伝子の突然変異に加え、トリソミー21(ダウン症候群)、トリソミー13(パトー症候群)、トリソミー18(エドワーズ症候群)、モノソミーX(ターナー症候群)及び他の性染色体異常(例えばクラインフェルター症候群(XXY))等の染色体異常による先天性欠損もある。この場合には、該当染色体によりコードされる「ハウスキープ」遺伝子が異なる量で存在するので、増幅フラグメントの量と正常染色体構造における量の差をマスマススペクトロメトリにより測定することができる。

更に、糖尿病、動脈硬化症、肥満、種々の自己免疫疾患及び癌(例えば結腸直腸、乳房、卵巣、肺)等の多数の疾病は特定

のDNA配列が個体に素因を与えるらしいということが立証されつつある。また、「DNAフィンガープリント」(例えば「ミニ及びマイクロサテライト配列」等の多型性)の検出も同一性又は遺伝(例えば父親確定又は母親確定)を判定す

るのに有用である。
後記実施例4及び12はE2、E3及びE4対立遺伝子によりコードされるヒトアポリボタンパク質Eの3種の異なるアイソフォームの任意のものを同定するためのマスマススペクトロメーターによる方法について記載する。例えば、適当な制限エンドヌクレアーゼで消化後に得られるDNAフラグメントの分子量を使用して突然変異及び/又は特定対立遺伝子の存在を検出することができる。

生物試料に応じて遺伝病、染色体異常又は遺伝素因の診断を出生前又は後に実施することができる。

癌の診断

本発明は、腫瘍又は癌の存在の早期発見を実現するマスマススペクトロメーターによる好ましい方法を提供する。例えば実施例13に記載するように、テロメア反復増幅プロトコル(TRAP)と基質プライマーのテロメラーゼ特異的伸長を併用した

後、反復構造に相補的な第2のプライマーを使用する増幅段階によりテロメラーゼ特異的伸長産物を増幅して得た伸長ラダーは、MALDI-TOFマスマススペクトロメトリによりテロメラーゼ活性及び発癌の徴候として容易に検出された。

あるいは実施例14に記載するように、RT-PCRによる腫瘍又は癌関連遺伝子(例えばヒトチロシン5-ヒドロキシラーゼ)の発現とマスマススペクトロメトリによる増幅産物の分析を使用して腫瘍又は癌を検出することができる(例えばチロシン5-ヒドロキシラーゼによるカテコールアミンの生合成は神経芽細胞腫の特徴である)。

更に、プライマーオリゴ塩基伸長反応とマスマススペクトロメトリによる産物の検出は、実施例15に記載するようにII型多発性内分泌腫瘍症候群(MEN II)の誘発に関係するRET癌原遺伝子コドン634等の癌遺伝子の存在を検出するための迅速な手段を提供する。

感染の診断

ウイルス、細菌、真菌及び他の感染性生物は宿主細胞に含まれる配列とは異なる特定核酸配列を含む。感染性生物に特異的な核酸配列を検出又は定量すること

要である。ヒト及び動物に感染し、本発明の方法により検出可能な疾患の例としては、Retroviridae (例えばHIV-1 (HTLV-III、LAV又はHTLV-III/LAVともいう。例えばRatnerら(1985) Nature 313:227-284; Wain-Hobsonら(1985) Cell 40:9-17参照)、HIV-2 (Guyaderら(1987) Nature 328:662-669; ヨーロッパ特許公開第0269520号; Chakrabartiら(1987) Nature 328:543-547; 及びヨーロッパ特許出願第0655501号参照)、及び他の単離菌株(例えばHIV-LP (国際PCT出願第WO94/00562号、発明の名称“A Novel Human Immunodeficiency Virus”参照))等のヒト免疫不全ウイルス); Picornaviridae (例えばポリオウイルス、A型肝炎ウイルス(例えばGustら(1983) Intervirology 20:1-7参照)、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス); Calciviridae (例えば胃腸炎を誘発する菌種); Togaviridae

(例えばウマ脳脊髄炎ウイルス、風疹ウイルス); Flaviridae (例えばデング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス); Coronaviridae (例えばコロナウイルス); Rhabdoviridae (例えば水泡性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス); Filoviridae (例えばエボラウイルス); Paramyxoviridae (例えばパラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス); Orthomyxoviridae (例えばインフルエンザウイルス); Bunyaviridae (例えばハンタウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルス及びナイロウイルス); Arenaviridae (出血熱ウイルス); Reoviridae (例えばレオウイルス、オルビウイルス及びロタウイルス); Birnaviridae; Hepadnaviridae (B型肝炎ウイルス);

erobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pasturella multocida、バクテロイデス種、Fusobacterium nucleatum、Streptobacillus moniliformis、Treponema pallidum、Treponema pertenuis、Leptospira及びActinomyces israeliiが挙げられる。

感染性真菌の例としては、Cryptococcus

neoformans、Histoplasma capsulatum、Coccidioides immitis、Blastomyces dermatitidis、Chlamydia trachomatis、Candida albicansが挙げられる。他の感染性生物(即ち原生生物)としては、Plasmodium falciparumとToxoplasma gondiiが挙げられる。

本発明の方法はターゲット配列の既知配列情報と既知突然変異部位を利用するが、新しい突然変異を検出することもできる。例えば図8に示すように、1種以上のスクリーナーゼと対応する相補的核酸配列をもつ固体支持体に捕獲したフラグメントを使用して生物試料から得た核酸分子の転写物を特異的に消化することができる。ハイブリダイゼーションの検出と捕獲したターゲット配列の分子量は、遺伝子中の突然変異の有無とその場所に関する情報を提供する。あるいは、1種以上の特異的エンドヌクレアーゼによりDNAを開裂し、フラグメントの混合物を形成することができる。野生型と突然変異フラグメントの混合物の分子量を比較することにより突然変異を検出する。

特定末端をもつフラグメントの生成によるシーケンシング

別の態様では、ターゲット核酸から特定末端をもつフラグメントを生成し、マスマススペクトロメトリーにより各フラグメントの質量を測定し、フラグメントを並べてより大きいターゲット核酸の配列を決定することにより、比較的大きいターゲット核酸の正確な配列決定が得られる。好ましい態様では、特定末端をもつフ

Parvoviridae (パルボウイルス); Papovaviridae (パピローマウイルス、ポリオマウイルス); Adenoviridae (大半のアデノウイルス); Herpesviridae (単純ヘルペスウイルス(HSV)1及び2、水痘ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、

ヘルペスウイルス); Poxviridae (痘毒ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス)及びIridoviridae (例えばアフリカブタ熱ウイルス)並びに未分類ウイルス(例えば海綿核脳症の病原体、(B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)δ肝炎病原体、非A、非B肝炎病原体(クラス1=体内感染;クラス2=親からの感染(即ちC型肝炎); Norwalkと関連ウイルス及びアストロウイルス)が挙げられる。

感染性細菌の非限定的な例としては、Helicobacter pylori、Borrelia burgdorferi、Legionella pneumophila、ミコバクテリア種(例えばM. tuberculosis、M. avium、M. intracellulare、M. kansasii、M. gordonae)、Staphylococcus aureus、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Listeria monocytogenes、Streptococcus pyogenes (A群連鎖球菌)、Streptococcus agalactiae (B群連鎖球菌)

菌)、Streptococcus (ビリダンス群)、Streptococcus faecalis、Streptococcus bovis、Streptococcus (嫌気性種)、Streptococcus pharyngitidis、Streptococcus pneumoniae、病原性カンピロバクター種、腸球菌種、Haemophilus influenzae、Bacillus anthracis、Corynebacterium diphtheriae、コリネバクテリウム種、Erysipelothrix rhusiopathiae、Clostridium perfringens、Clostridium tetani、Ent

ラゲメントは特定塩基を末端にもつ部分又は完全フラグメントである。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する方法の1例は、例えば転写反応後に塩基特異的リボヌクレアーゼを使用する。好ましい塩基特異的リボヌクレアーゼはT₁-リボヌクレアーゼ(G特異的)、U₂-リボヌクレアーゼ(A特異的)、PhyM-リボヌクレアーゼ(U特異的)及びリボヌクレアーゼA(U/特異的)から選択される。他の有効な塩基特異的リボヌクレアーゼは実施例16に記載するアッセイを使用して同定することができる。修飾ヌクレオチドを未修飾ヌクレオチドと転写反応させることが好ましい。修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドを約1:1の好ましい比率で組み込むように適当な濃度で転写反応に加えると最も好ましい。あるいは、修飾ヌクレオチ

ドと未修飾ヌクレオチドで2回別々にターゲットDNAの転写を行い、結果を比較してもよい。好ましい修飾ヌクレオチドとしては、ホウ素又は臭素修飾ヌクレオチド(Porterら(1995) Biochemistry 34:11963-11969; Hasanら(1996) Nucl. Acids Res. 24:2150-2157; Liら(1995) Nucleic Acids Res. 23:4495-4501)、α-チオ修飾ヌクレオチド及び上述のような質量改変ヌクレオチドが挙げられる。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する別の方法は、増幅と塩基特異的ターミネーション反応を併用実施する。例えば、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的親和性をもつ酵素による重合が指数増幅を生じ、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ酵素が重合を停止してシーケンシング産物を生じるように、連鎖停止ヌクレオチドに対して各々異なる親和性をもつ少なくとも2種の異なるポリメラーゼ酵素を使用して増幅とターミネーション反応を併用実施することができる。

増幅とシーケンシングの併用は、ポリヌクレオチド合成能を

もつ酵素(例えばポリメラーゼ)を使用する任意増幅法を利用することができる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づいた好ましい方法の1例は、1)2個の

1 本鎖 (ss) DNA 分子 (鎖型: センス及びアンチセンス鎖) を得るのに適した温度及び時間にわたって 2 本鎖 (ds) DNA 分子を変性する段階と、2) ss DNA 鎖型を含むプライマーを得るのに適した温度及び時間にわたって少なくとも 1 個の ss DNA 鎖型にハイブリダイズする少なくとも 1 個のプライマーと鎖型を接触させる段階と、3) 鎖型を含むプライマーを適当な温度及び適当な時間にわたって (i) 完全な 1 組の連鎖伸長ヌクレオチド、(ii) 少なくとも 1 個の連鎖停止ヌクレオチド、(iii) 連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもつ第 1 の DNA ポリメラーゼ及び (iv) 連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ第 2 の DNA ポリメラーゼと接触させる段階からなる 3 段階の熱処理を含む。

段階 1) ~ 3) は所望量の増幅シーケンシングラダーを得るために十分な回数 (サイクル) 順次実施することができる。特定塩基を末端にもつフラグメントの所望量に応じてサイクルの実施回数を決定する。サイクル数が増すと増幅レベルは増すが、

その後の検出感度が低下する。従って、約 50 サイクル以上実施するのは一般に望ましくなく、約 40 サイクル未満 (例えば約 20 ~ 30 サイクル) 実施するとより好ましい。

核酸配列を同時に増幅及び連鎖停止するための別の好ましい方法は、鎖置換増幅 (SDA) (例えば Walker ら (1994) Nucl. Acids Res. 22: 2670-77; ヨーロッパ特許公開第 0684315 号、発明の名称 "Strand Displacement Amplification Using Thermophilic Enzymes" 参照) を利用する。主にこの方法は、1) 2 個の 1 本鎖 (ss) DNA 分子 (鎖型: センス及びアンチセンス鎖) を得るのに適した温度及び時間にわたって 2 本鎖 (ds) DNA 分子を変性させる段階と、2) ss DNA 鎖型を含むプライマーを得るのに適した温度及び時間にわたって制限エンドヌクレアーゼ (RE) の認識/開裂部位を含み且つ少なくとも 1 個の ss DNA 鎖型にハイブリダイズする少なくとも 1 個のプライマー (P) と鎖型を接触させる段階と、3) 鎖型を含むプライマーを適当

A ポリメラーゼ) も増幅混合物に加え、増幅の忠実度を増進してもよい。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成するための更に別の方法は、適量のターゲット核酸を特異的エンドヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼと接触させる。核酸の元の 5' 及び/又は 3' 末端にタグを付けてフラグメントを並べ易くすることが好ましい。in vitro 核酸転写産物を分析する場合に

は 3' 末端にタグを付け、3' 不均一性、早期停止及び非特異的伸長の影響を最小限にすると特に好ましい。5' 及び 3' タグは天然 (例えば 3' ポリ A テール又は 5' もしくは 3' 不均一性) でもよいし、人工でもよい。好ましい 5' 及び/又は 3' タグは質量改変に関して上述したものから選択される。

以下、実施例により本発明の方法を更に説明するが、これにより発明を制限するものではない。

実施例 1

固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドの直接 MALDI-TOF 脱着

CpG (Controlled Pore Glass) 1g を 3- (トリエトキシシリル) エポキシプロパンで官能化し、ポリマー表面に OH 基を形成した。β-シアノエチルホスホロアミダイト (Koster ら (1994) Nucl. Acids Res. 22: 4539) と TAC N 保護基 (Koster ら (1981) Tetrahedron 37: 362) を使用して DNA 合成器 (Milligen, Model 7500) で OH-CpG 13mg から標準オリゴヌクレオチド合成を実施し、50 ヌクレオチドが「ハイボセティカ

ル」50 量体配列に相補的な 3' -Ts-50 量体オリゴヌクレオチド配列を合成した。メタノール中飽和アンモニアで室温で 2 時間脱保護すると、DMT 基の測定によると CpG 1g 当たり約 10 μmol の 55 量体を含む CpG が得られた。この 55 量体を鎖型として使用し、(5' -DMT 基をもつ) 25 量体及び (DMT 基をもたない) 40 量体とハイブリダイズした。反応容量は 100 μl であり、20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂ 及び 25mM NaCl 溶液 (26 量体又は 40 量体) 中に鎖型としての CpG 結合

な温度及び適当な時間にわたって (i) 完全な 1 組の連鎖伸長ヌクレオチド、(ii) 少なくとも 1 個の連鎖停

止ヌクレオチド、(iii) 連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもつ第 1 の DNA ポリメラーゼ、(iv) 連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ第 2 の DNA ポリメラーゼ及び (v) プライマー認識/開裂部位をニックする RE と接触させる段階からなる 3 段階を 1 サイクルとして含む。

段階 1) ~ 3) は所望量の増幅シーケンシングラダーを得るために十分な回数 (サイクル) 順次実施することができる。PCR に基づく方法と同様に、特定塩基を末端にもつフラグメントの所望量に応じてサイクルの実施回数を決定する。好ましくは 50 サイクル未満、より好ましくは約 40 サイクル未満、最も好ましくは約 20 ~ 30 サイクルを実施する。

増幅と連鎖停止反応の併用では約 0.5 ~ 約 3 単位のポリメラーゼを使用することが好ましい。約 1 ~ 2 単位を使用すると最も好ましい。PCR 又は他の熱増幅法と併用するのに特に好ましいポリメラーゼは Taq DNA ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim)、AmpliTaq FS DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer)、Deep Vent (exo-)、Vent、Vent (exo-) 及び

Deep Vent DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs)、Thermo Sequenase (Amersham) 又は exo (-) Pseudococcus furiosus (Pfu) DNA ポリメラーゼ (Stratagene, Heidelberg, ドイツ)、AmpliTaq、Ultman、9 degree Nm、Tth、Hot Tub 及び Pyrococcus furiosus 等の熱安定ポリメラーゼである。更に、ポリメラーゼは 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性をもたないことが好ましい。

連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつポリメラーゼと比較的低い親和性をもつポリメラーゼに加え、ブルーフリーディング能をもつ第 3 の DNA ポリメラーゼ (例えば Pyrococcus woesei (Pwo) DN

55 量体約 1nmol と、等モル量のオリゴヌクレオチドを含む。混合物を 65 °C に 10 分間加熱し、30 分間で 37 °C まで冷却した (アニーリング)。ポリマーに結合した鎖型にハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドを遠心分離後、氷冷 50mM クエン酸アンモニウム各 100 μl で 3 回洗浄/遠心分離することにより除去した。ビーズを風乾し、マトリックス溶液 (1:1 アセトニトリル/水中 3-ヒドロキシピコリン酸/10mM クエン酸アンモニウム) と混合し、MALDI-TOF マススペクトロメトリーにより分析した。結果を図 10 及び 11 に示す。

実施例 2

18 量体と 19 量体のエレクトロスプレー (ES) デソープション及び区別

2-プロパノール/10mM 炭酸アンモニウム (1/9, v/v) 中 50 pmol/μl の濃度の DNA フラグメントをエレクトロスプレーマススペクトロメーターにより同時に分析した。

図 12 に示すように 18 量体と 19 量体はエレクトロスプレーマススペクトロメトリーにより脱着及び区別できる。

実施例 3

1 段階ジデオキシ伸長による囊胞性線維症突然変異 ΔF508 の検出と MALDI-TOF マススペクトロメトリーによる分析 (脱着オリゴヌクレオチド 1 塩基伸長-COSBE)

COSBE 法の原理を図 13 に示し、同図中、夫々 N は正常及び M は突然変異検出プライマーである。

材料と方法

PCR 増幅及び鎖固定化。標準 PCR 条件 (30 サイクル: 1 分間 95 °C、1 分間 55 °C、2 分間 72 °C) を使用してエキソン 10 特異的プライマーで増幅を実施し、逆プライマーをビ

オチンで 5' 標識し、カラム精製した (Oligopurification Cartridge, Cruachem)。増幅後に増幅産物をカラム分離 (Q

igen Quickspin) により精製し、標準プロトコールに従ってストレプトアビジンをコートした磁性ビーズ (Dynabeads, Dynal, ノルウェー) に固定化し、0.1M NaOH を使用してDNAを酸性させ、0.1M NaOH, 1×B+W緩衝液とTE緩衝液で洗浄し、非ビオチン化セレンを除去した。

COSBE条件。連結したアンチセンス鎖を含むビーズを反応混合物1 (10×Taq緩衝液2μl, Taq Polymerase 1μl (1単位)、2mM dGTP 2μl 及びH₂O 13μl) 18μlに再懸濁し、80℃で5分間インキュベート後、反応混合物2 (COSBEプライマー各100ng) を加えた。温度を60℃まで下げ、混合物を5分間のアニーリング/伸長時間にわたってインキュベートした後、ビーズを25mM酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA)、次いで50mMクエン酸アンモニウムで洗浄した。

プライマー配列。慣用ホスホロアミダイト化学 (Sinha (1984) Nucleic Acids Res. 12:

4539) を使用してPerspective Biosystems Expedite 8900 DNA Synthesizer で全プライマーを合成した。(各々3' 末端の1塩基前に意図的ミスマッチを含む) COSBEプライマーは、正常の5' 末端から2塩基を除去した以外は従来のARMS研究 (Ferreira (1992) Am J Hum Genet 51:251-262) で使用されているものを用いた。

Ex10 PCR (順): 5'-BTO-GCA AGT GAA TCC TGA GCG TG-3' (配列番号1)

Ex10 PCR (逆): 5'-GTG TGA AGG GTT CAT ATG C-3' (配列番号2)

COSBE Δ-F508-N 5'-ATC TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAC A-3' (28量体) (配列番号3)

COSBE Δ-F508-N 5'-GTA TCT ATA TTC ATC ATA GGA AAC ACC ATT-3' (30量体) (配列番号4)

マスペクトロメトリーによるヒトアポリポタンパク質Eアイソフォームの区別
アポリポタンパク質E (アポE) はリポタンパク質のタンパク成分であり、脂質代謝に重要な役割を果たす。例えば、コレステロール輸送、リポタンパク質粒子の代謝、免疫調節及び多数の脂質分解酵素の活性化に関与している。

ヒトアポEでは (E2、E3及びE4対立遺伝子によりコードされる) 3種のアイソフォームがよく知られている。E3対立遺伝子が最もよく知られている。E2対立遺伝子は血漿中の

コレステロール濃度を低下させることが示されているので、動脈硬化症の発生に対する防御効果をもつと思われる。E2対立遺伝子の一部をコードするDNAを配列番号130に示す。最後に、E4アイソフォームはコレステロール濃度の増加に相関関係があるとされており、動脈硬化症の素因を与える。従って、特定個体のアポEの存在は心血管病の発生の危険の重要な決定基である。

図19に示すように、アポリポタンパク質EをコードするDNAの試料を被験体から獲得し、(例えばPCRにより) 増幅し、増幅産物を適当な酵素 (例えばCfoI) で消化することができる。得られた制限消化産物をその後、種々の手段により分析することができる。図20に示すように、アポリポタンパク質Eの3種のアイソタイプ (E2、E3及びE4) は異なる核酸配列をもち、従って区別可能な分子量値をもつ。

図21A~Cに示すように、異なるアポリポタンパク質E遺伝子型は3.5% Met Phor Agarose Gel又は12%ポリアクリルアミドゲル中で異なる制限パターンを示す。図22及び23に示すように、種々のアポリポタンパク質E遺伝子型もマスペクトロメトリーにより正確且つ迅速に決定することができる。

実施例5.

血清試料中のB型肝炎ウイルスの検出

材料と方法

試料調製

).

マスペクトロメトリー。洗浄後、ビーズを18Mohm/

cm H₂O 1μlに再懸濁した。マトリックス (Wu (1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7:142-146) 溶液 (1:1H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、0.7Mニ塩基性クエン酸アンモニウム) と再懸濁したビーズ (Tangら (1995) Rapid Commun. Mass Spectrom. 8:727-730) 各300nLを試料ターゲット上で混合し、風乾した。20個までの試料をプローブターゲットディスクにスポットして未改造Thermo Bioanalysis (旧Finnigan) Versions 2000 MALDI-TOFのソース領域に導入し、ターゲット及び変換ダイノードで夫々5及び20kVのリフレクトロンモードで運転した。理論平均分子量 (M_r (calc)) を原子組成から計算した。市販ソフトウェアを使用し、外部校正を使用してピーク質量中心を測定し、1.08Daを差し引いて電荷をもつプロトン質量を修正し、実測M_r (exp) 値を得た。

スキーム。結合した鎖型にアニーリング後、N及びMプライマー (夫々8508.6及び9148.0Da) にdGTPを加えると、可変 (V) 位置に正しいワトソン-クリック塩基対

をもつプライマーのみがポリメラーゼにより伸長する。即ち、VがNの3' 末端塩基に対合する場合には、Nは8837.9Da産物 (N+1) まで伸長する。同様に、VがM末端に正しく対合している場合には、Mは9477.3Da M+1産物まで伸長する。

結果

図14~18はCOSBE反応産物の代表的な質量スペクトルを示す。ビオチン化アンチセンス鎖を結合する前に増幅産物を精製すると、良好な結果が得られた。

実施例4

ウイルスDNAのフェノール/クロロホルム抽出と最終エタノール沈殿は標準プロトコールに従って実施した。

第1回PCR

血清からのDNA調製物5μlを使用して各反応を実施した。各プライマー15pmolとTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer, Weiterstadt, ドイツ) 2単位を使用した。各dNTPの終濃度は200μMとし、最終反応容量は50μlとした。10×PCR緩衝液 (Perkin Elmer, Weiterstadt, ドイツ) は100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン (w/v) を含むものとした。

プライマー配列:

| プライマー | 配列 | 配列番号 |
|-------|--------------------------------------|------|
| 1 | 5'-GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA-3' | 5 |
| 2 | 5'-CTGACTACTAATTCCTGGATGCTGGGTCT-3' | 6 |

入れ子PCR:

夫々第1回PCR反応産物1μl又は第1回PCR産物の1:10希釈液を鎖型として使用して各反応を実施した。各プライマー100pmol、Pfu (exo-) DNAポリメラーゼ (Stratagene, Heidelberg, ドイツ) 2.5u、終濃度200μMの各dNTP及び10×Pfu緩衝液 (200mM Tris-HCl, pH8.75, 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 1%Triton X-100, 1mg/ml BSA (Stratagene, Heidelberg, ドイツ)) 5μlを最終容量50μl中で使用した。反応はサーモサイクラー (OmniGene, MWG-Biotech, Ebersberg, ドイツ) で92℃1分間、60℃1分間及び72℃1分間を20サイクル繰り返すプログラムを使用して実施した。オリゴデオキシヌクレオチド (MWG-Biotech, Ebersberg, ドイツから購入したHPLC精製品) の配列は以下の通りである。

HBV13:5'-TTGCTTGAAGTGCAGTATGCT-3' (配列番号7)
HBV15bio: ヒオチン-5'-AGCTCTATATCGGGAAGCCT-3' (配列番号8)

増幅産物の精製:

各スペクトルを記録するために、(上述のように実施した)各PCR産物50 μ lを使用した。以下の手順に従って精製を行った。Ultrafree-MC濾過装置(Millipore, Eschborn, ドイツ)を製造業者のプロトコールに従って使用して限外濾過を行い、8000rpmで20分間遠心分離した。ストレプトアビジンDynabeads (DynaI, Hamburg, ドイツ) 25 μ l (10 μ g/ μ l)を製造業者の指示に従って調製し、B/W緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl) 25 μ lに再懸濁した。この懸濁液をまだ濾過装置にあるPCR試料に加え、混合物を15分間室温で静かに震盪しながらインキュベートした。懸濁液を1.5mlエッペンドルフチューブに移し、Magnetic Particle Collector, MPC (DynaI, Hamburg, ドイツ)により上清を除去した。ビーズを0.7Mクエン酸アンモニウム溶液(pH8.0) 50 μ lで2回洗浄した(上清は各回毎にMPCを使用して除去した)。ビーズからの開裂は90℃でホルムアミドを使用して実施することができる。上清

をspeed vacで約1時間乾燥し、超純水(MilliqUF plus Millipore, Eschborn, ドイツ) 4 μ lに再懸濁した。この調製物をMALDI-TOFMS分析に使用した。

MALDI-TOF MS:

試料0. 5 μ lを試料ホルダーにピペットで分注後、すぐにマトリックス溶液(0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸, 50%アセトニトリル, 70mMクエン酸アンモニウム)0.5 μ lと混合した。この混合物を室温で乾燥し、マスマススペクトロメーターに導入した。全スペクトルはリフレクトロン(5keVイオン源, 20keV後加速)と337nm窒素レーザーを取り付けたFinnig

損失を避けるために限外濾過膜に直接行った。固定化後、ビーズをクエン酸アンモニウムで洗浄し、カチオン交換を行った(Pielesら(1993) Nucleic Acids Res. 21:3193-3196)。25%アンモニアを使用して固定化DNAをビーズから分離するとDNAをビーズから非常に短時間で分離することができ、ナトリウムや他のカチオンも混入しなかった。

入れ子PCRとMALDI-TOF分析は血清分析結果を知らずに実施した。ウイルス力価が不明のため、第1回PCRの各試料は鋳型として夫々未希釈のまま及び1:10に希釈して使用した。

試料1はHbs及びHbe抗原試験で陽性であり且つドットプロット分析で陰性であった慢性活性HBV感染患者から採取

した。試料2はドットプロット分析でHBV陽性であった活性HBV感染と顕著なウイルス血症をもつ患者からの血清試料とした。試料3は変性血清試料であり、従って、トランスアミナーゼ濃度を上げると血清分析を実施することができず、肝疾患が検出されることを示した。オートラジオグラフ分析(図24)でこの試料の第1回PCRは陰性であった。しかし、HBV感染の多少の徴候があった。この試料は精製操作後に低レベルの量ではあるが増幅産物を検出できるので、MALDI-TOF分析に重要である。試料4はHBV感染が治癒した患者から採取した。試料5及び6は慢性活性HBV感染患者から採取した。

図24は入れ子PCR反応のPAGE分析の結果を示す。試料1、2、3、5及び6には増幅産物が明白に示される。試料4では増幅産物は生成されず、血清分析通り、確かにHBV陰性である。陰性及び陽性対照は夫々十及び一で示す。未希釈鋳型を使用した場合にもレーン2、5、6及び十には増幅アーチファクトが見られる。これらのアーチファクトは鋳型を1:10に希釈して使用した場合には生じなかった。試料3では鋳型を希釈しない場合にのみ増幅産物を検出できた。PAGE分析結果は上述のように試料3を除き、血清分析により得られたデータ

に一致している。

特表2002-507883

an MAT Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, ドイツ)を使用して陽イオンモードで測定した。40量体と100量体の混合物で校正を行った。各試料を種々のレーザーエネルギーで測定した。陰性試料では、増幅産物はレーザーエネルギーの高低に拘わらず検出されなかった。陽性試料ではレーザーエネルギーを変えても試料スポットの種々の場所で増幅産物が検出された。

結果

入れ子PCRシステムを使用し、HBVコア抗原(HBcAg)をコードするHBVゲノムのc領域に相補的なオリゴヌクレオチド(プライマー1:相補鎖のマップ1763位から開始、プライマー2:マップ2032位から開始)を使用して血液試料中のHBV DNAを検出した。DNAは標準プロトコールに従って患者血清から単離した。第1回PCRは第1組のプライマーを使用してこれらの調製物からのDNAで実施した。HBV DNAが試料中に存在する場合には、269bpのDNAフラグメントが生成された。

第2回反応では、第1回PCRで生成されたPCRフラグメント内の領域に相補的なプライマーを使用した。HBV関連増幅産物が第1回PCRに存在する場合には、この入れ子PCRで67bpのDNAフラグメントが生成された(図25A参照)。入れ子PCRシステムを検出に使用すると、高い感度が得られ、外部PCRの特異性対照としても有用である(RoIfsら(1992) PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer Heiderberg)。精製低下は避けられないが、第2回PCR

で生成されるフラグメントの量が問題ない検出を確保するために十分高いという利点もある。

ストレプトアビジンDynabeadsで限外濾過して試料を精製した。この精製を行ったのは、立体上の理由により短いプライマーフラグメントのほうにビーズに高い効率で固定化されるからである。固定化は非特異的膜吸着による物質

図25Aは上述のように生成及び精製した試料番号1からの入れ子増幅産物の質量スペクトルを示す。20754Daのシグナルは1本鎖増幅産物を表す(計算値:20735Da、ビーズから開裂した増幅産物の両鎖の平均質量)。計算値と実測地の質量差は19Da(0.09%)である。図25Aに示すように、試料番号1は多量の増幅産物を生成し、はっきり検出された。

図25Bは試料番号3から得られたスペクトルを示す。図24に示すように、このセクションで生成された増幅産物の量は試料番号1からの量よりも著しく少ない。しかし、増幅産物は質量20751Da(計算値20735)ではっきり現れている。質量差は16Da(0.08%)である。図25Cに示すスペクトルは(図24と同様に)HBV陰性の試料番号4から得た。予想通り、増幅産物に対応するシグナルは検出できなかった。図25に示す全試料をMALDI-TOFMSで分析した処、全HBV陽性試料で増幅産物が検出されたが、HBV陰性試料では検出されなかった。これらの結果は数回の独立した実験で再現された。

実施例6

MALDI-TOFマスマススペクトロメーターによるリガーゼ連鎖反応産物の分析材料と方法

オリゴデオキシヌクレオチド

ヒオチン化したものを除き、他の全オリゴヌクレオチドは β -シアノエチルホスホロアミダイト法(Sinha, N. D.ら(1984) Nucleic Acids Res. 12:4539-4577)を使用してMilligen 7500 DNA Synthesizer (Millipore, Bedford, MA, 米国)で0.2 μ mol規模で合成した。オリゴデオキシヌクレオチドは標準プロトコールに従ってRP-HPLC精製及び脱保護した。ヒオチン化オリゴデオキシヌクレオチドはBiometra, Göttingen, ドイツから購入した(HPLC精製物)。使用したオリゴヌクレオチドの配列と計算分子量は以下の通りである。

| | | |
|---|--|----|
| A | 5'-p-TTGTGCCACGCGTTTGGGAATGTA(7521Da) | 9 |
| B | 5'-p-AGCAACGACTGTTTGGCCGCCAGTTG(7948Da) | 10 |
| C | 5'-bio-TACATTCCCAACCGCGTGGCACAAC(7960Da) | 11 |
| D | 5'-p-AACTGGCGGGCAACAGTCGTTGCT(7708Da) | 12 |

オリゴヌクレオチドA及びDの5-リン酸化

これは公表手順に従ってポリヌクレオチドキナーゼ (Boehringer, Mannheim, ドイツ) を用いて実施し、5'-リン酸化オリゴヌクレオチドを精製せずにLCRに使用した。

リガーゼ連鎖反応

LCRは、大腸菌 *lacI* 遺伝子の野生型と、*lacI* 遺伝子のbp191に単一点突然変異をもつこの遺伝子の突然変異体とを夫々担持した2種の異なるpBluescript KIIファージミドを含むリガーゼ連鎖反応キット (Stratagene, Heidelberg, ドイツ) とPfu DNAリガーゼを使用して実施した。

各反応で以下のLCR条件を使用した。最終容量20 μ lの緩衝液中、鋳型DNA100pg (0.74fmol)、キャ

リヤーとして音波処理サケ精子DNA500pg、各5'-リン酸化オリゴヌクレオチド25ng (3.3pmol)、各非リン酸化オリゴヌクレオチド20ng (2.5pmol)、Pfu DNAリガーゼ4Uを使用し、ss50量体 (1fmol) を鋳型として使用し、この場合にはオリゴCもバイオチン化した。全反応はサーモサイクラー (OmniGene, MWG-Biotech, Ebersberg, ドイツ) で4分間92℃、2分間60℃及び25サイクル20秒間92℃、40秒間60℃のプログラムに従って実施した。HPLC分析以外は、バイオチン化連結遊離体Cを使用した。対照実験では、バイオチン化及び非バイオチン化オリゴヌクレオチドは同一のゲル電気泳動結果を示した。反応物を7.5%ポリアクリルアミドゲルで分析した。連結産物1 (オリゴA及びB) の計算質量

free-MCフィルターユニット (Millipore, Eschborn, ドイツ) で濃縮した。濃縮後、試料を1 \times B/W緩衝液300 μ lで洗浄し、ストレプトアビジンDynaBeadsを加えた。ビーズをUltrafree-MC濾過装置で1 \times B/W緩衝液300 μ lで1回洗浄し、上記のように処理した。ビーズを1 \times B/W緩衝液30~500 μ lに再懸濁し、1.5mlエッペンデルフチューブに移した。上清を除去し、ビーズを0.7Mクエン酸アンモニウム (pH8.0) 50 μ lで2回洗浄した。最後に、ビーズをアセトン30 μ lで1回洗浄し、超純水1 μ lに再懸濁した。ビーズに固定化後の連結混合物を下記のようにMALDI-TOF-MS分析に使用した。

MALDI-TOF-MS

ストレプトアビジンをコートした磁性ビーズにDNAを固定

化したものの懸濁液を試料ホルダーにピペットで分注後、すぐにマトリックス溶液 (50%アセトニトリル中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、70mMクエン酸アンモニウム) 0.5 μ lと混合した。この混合物を周囲温度で乾燥し、マスマスペクトロメーターに導入した。全スペクトルはリフレクトロン (5keVイオン源、20keV後加速) と窒素レーザー (337nm) を取り付けたFinnigan MAT Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, ドイツ) を使用して陽イオンモードで測定した。Pfu DNAリガーゼの分析では、溶液0.5 μ lを試料ホルダーでマトリックス溶液1 μ lと混合し、上述のように調製した。未精製LCRの分析では、LCR1 μ lをマトリックス溶液1 μ lと混合した。

結果

大腸菌 *lacI* 遺伝子を単純なモデルシステムとして使用し、リガーゼ連鎖反応で生成される産物の検出法としてのMALDI-TOF-MSの適合性を調べた。この鋳型システムはpBluescript KIIファージミドに大腸菌 *lacI* 野生型遺伝子を含み、同一ファージミドにbp191に単一点突然変異 (C→T転位、配列番号131) をもつ大腸菌 *lacI*

:15450Da、連結産物2 (オリゴC及びD) の計算質量:15387Da

SMART-HPLC

Pharmacia Mono Q, PC 1.6/5カラムを使用してSMARTシステム (Pharmacia, Freiburg, ドイツ) でイオン交換HPLC (IE HPLC)

を実施した。溶離剤は緩衝液A (25mM Tris-HCl, 1mM EDTA及び0.3M NaCl, pH8.0) と緩衝液B (1M NaClとした以外はAと同様) を使用した。100%Aで5分間流速50 μ l/minから出発し、30分間で0~70%Bの勾配を加えた後、2分間で100%Bまで増加し、100%Bに5分間維持した。野生型又は突然変異鋳型で実施した2種のLCRブール (40 μ l) を注入した。

MALDI-TOF-MS用試料調製

固定化DNAの調製:各スペクトルを記録するために、(上記のように実施した) 2種のLCRをブールし、2 \times B/W緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl) で1:1に希釈した。試料にストレプトアビジンDynaBeads (Dyna, Hamburg, ドイツ) 5 μ lを加え、混合物を周囲温度で15分間静かに震盪しながら結合させた。Magnetic Particle Collector, MPC (Dyna, Hamburg, ドイツ) を使用して上清を除去し、ビーズを0.7Mクエン酸アンモニウム溶液 (pH8.0) 50 μ lで2回洗浄した (上清は毎回毎にMPCを使用して除去した)。ビーズを超純水

(MilliQ, Millipore, Bedford, Massachusetts) 1 μ lに再懸濁した。

限外濾過とストレプトアビジンDynaBeadsの併用:スペクトルを記録するために、(上記のように実施した) 2種のLCRをブールし、2 \times B/W緩衝液で1:1に希釈し、製造業者の指示に従って5000NMWL Ultra

遺伝子を含む。4種の異なるオリゴヌクレオチドを使用した処、大腸菌 *lacI* 野生型遺伝子が存在する場合しか連結しなかった (図26)。

Pfu DNAリガーゼを使用し、各陽性反応で少なくとも1pmolの連結産物が得られるようにLCR条件を最適化した。連結反応をSMARTシステムでポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) とHPLCにより分析した (図27、28及び29)。図27は野生型鋳型による陽性LCR (レーン1)、突然変異鋳型による陰性LCR (1及び2) 及び酵素とオリゴヌクレオチドを含み、鋳型の代わりにサケ精子DNAを含む陰性対照のPAGEを示す。ゲル電気泳動は、野生型鋳型を用いた反応でしか連結産物 (50bp) が生成されず、点突然変異をもつ鋳型やサケ精子DNAによる対照反応では増幅産物が生じないことを明示している。図28ではHPLCを使用して、同一条件下で野生型鋳型を用いて実施した2種のLCRのブールを分析した。連結産物ははっきりと現れた。図29は突然変異鋳型による2種の陰性LCRブールを分析したHPLCの結果を示す。図27に示すデータと結果をまとめると、このシステムが野生型鋳型を用いた場合しか有意量の連結産物

を生成しないことは明白であるが、このことはこれらのクロマトグラムからも裏付けられる。

適当な対照試験を実施し、LCR実験で用いる種々の化合物の保持時間を測定した。試験した化合物は4種のオリゴヌクレオチド (A、B、C及びD)、(連結産物と同一配列をもつ) 合成ds50量体、野生型鋳型DNA、音波処理サケ精子DNA及びPfu DNAリガーゼである。

どのような精製操作を実施すればLCR反応をMALDI-TOF-MSにより分析できるかを試験するために、未精製LCRのアリコート (図30A) と酵素ストック溶液のアリコート (図30B) をMALDI-TOF-MSで分析した。その結果、未精製LCRの全シグナルはPfu DNAリガーゼのMALDI-TOF-MS分析で得られたシグナルに対応するので、適切な試料調製は絶対必要であることが判明した。オリゴAと連結産物の計算質量値は夫々7521Da及び15450Daである。図30のデータは、酵素溶液が連結遊離体の予

想シグナルに反する質量シグナルを生じ、従って正確なシグナル帰属が不可能であることを示す。更に、スペクトルは分析物/マトリックス混合物の結晶化挙動に影響を与える酵素保存用

緩衝液の一部である洗剤 Tween 20 のシグナルも示した。

1 精製フォーマットではストレプトアビジンをコートした磁性ビーズを使用した。最近の論文に示したように、ビーズに共有結合した相補的 DNA フラグメントにワトソン-クリック塩基対合により固定化した DNA の直接脱着は可能であり、非ビオチン化鎖のみが脱着される (Tangら (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:3126-3131)。固定化 dsDNA を使用するこのアプローチは、非ビオチン化鎖のみが脱着されるように確保できる。非固定化 dsDNA を分析すると、両方の鎖が脱着され (Tangら (1994) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 7:183-186)、2 本の 1 本鎖の質量値に依存して広いシグナルになる。従って、このシステムを LCR に使用すると、オリゴ C の 5' 末端をビオチン化し、ストレプトアビジンをコートしたビーズに固定化するならば、計算質量 7521 Da の非連結オリゴヌクレオチド A とオリゴ A 及びオリゴ B からの連結産物 (計算質量: 15450 Da) のみが脱着される。この結果、LCR 遊離体及び産物を簡単に明確に同定できる。

図 31A は (上述のように実施した) LCR 産物をストレプ

トアビジン DynaBeads で精製し、ビーズから直接脱着した 2 種のブルから得た MALDI-TOF 質量スペクトルを示し、使用した精製法が (図 30 に比較して) 効率が高いことを示す。未連結オリゴ A に相当するシグナルと、連結産物に対応するシグナルを検出することができた。質量の計算値と実測値の一致は特筆に値し、連結産物の明確なピーク帰属と正確な検出が可能になる。他方、突然変異鎖型を用いた 2 種の LCR ブールから得たスペクトルに連結産物は検出されず、オリゴ A しか検出できなかった (図 31B)。特定鎖型の不在で連結反応を実施すると、LCR 条件の特異性及び選択性と MALDI-TOF 検出

連結したオリゴ C 及び D からはオリゴ A 及び B の連結産物 (計算質量 15450 Da) しか脱着できなかった。この新たに生成された DNA フラグメントは図 33A に 15448 Da の質量シグナルにより示される。図 32A に比較して、このスペクトルはこの試料調製法が改善された分解能と強度をもつシグナルを生じることを明白に示している。

実施例 7

プライマーの固相オリゴ塩基伸長による突然変異検出及び MALDI-TOF マススペクトロメトリーによる分析 (Primer Oligo Base Extension=Probe)

要約

固相オリゴ塩基伸長法は増幅 DNA で点突然変異と小欠失と小挿入を検出するものである。この方法は、DNA ポリメラーゼと 3 種の dNTP の混合物と欠損しているジデオキシヌクレ

オチドを使用してアフィニティ捕獲増幅鎖型上の可変ヌクレオチド位置に隣接してアニールする検出プライマーの伸長に基づく。得られた産物を標識せずに MALDI-TOF マススペクトロメトリーにより評価及び分解する。以下の実験の目的は、突然変異及び対立遺伝子を迅速且つ確実に決定することであった。

実験の説明

本方法は単一検出プライマーを使用した後、オリゴヌクレオチド伸長段階を実施し、MALDI-TOF マススペクトロメトリーにより容易に分解可能な長さで突然変異又は野生型対立遺伝子に特異的な数塩基の長さが異なる産物を得た。CFTR 遺伝子のエキソン 10 を例にとってこの方法を説明する。この遺伝子のエキソン 10 は、ホモ接合状態で嚥舌性線維症の臨床表現型を誘導する突然変異 (ΔF508) をもち、これは多数の民族群で最も一般的な突然変異である。

材料と方法

ゲノム DNA

ゲノム DNA は健康個体、ΔF508 突然変異のホモ接合又はヘテロ接合個体及び 1506S 突然変異のヘテロ接合個体か

特表 2002-507883

の感度が更に立証される。図 32 は陽性対照としてサケ精子 DNA のみを使用し、2 種の LCR ブールから得たスペクトルを示し、予想通り、オリゴ A しか検出できなかった。

図 31A に示す結果は図 27 のゲルのレーン 1 に相関でき、図 31B に示すスペクトルは図 27 のレーン 2 と等価であり、図 32 のスペクトルも図 27 のレーン 3 に対応する。これらの結果は図 28 及び 29 に示す HPLC 分析に一致する。ゲル電気泳動 (図 27) と HPLC (図 28 及び 29) は連結産物が

連結遊離体よりも過剰又はほぼ等量であることを示すが、MALDI-TOF マススペクトロメトリーによる分析は連結産物のほうが弱いシグナルを生じる (図 31A)。

連結産物シグナルの強度が低いのは、24 量体と 50 量体の脱着/イオン化効率が異なるためであると思われる。50 塩基対のデュプレックスの T_m 値は 24 塩基対に比較してかなり高いので、24 量体のほうがよく脱着できる。シグナル強度の低下はオリゴヌクレオチドが長い場合のほうが断片化度が高くなるためであると思われる。

ストレプトアビジン DynaBeads による精製に関係なく、図 32 は 2000 Da 付近の領域に微量の Tween 20 を示す。粘性コンシステンシーをもつ物質は結晶化プロセスに影響を与えるので、マススペクトロメトリーに有害であると思われる。従って、酵素保存用緩衝液の一部である Tween 20 とグリセロールはマススペクトロメーター分析前に完全に除去すべきである。このため、DynaBeads 処理前に付加的限外通過段階を含む改善精製法を検討した。この試料精製の結果、MALDI-TOF マススペクトロメトリー性能は確かに著しく改善された。

図 33 は夫々陽性 (図 33A) 及び陰性 (図 33B) の 2 種の LCR ブールから得たスペクトルを示す。陽性反応はオリゴ C 及び D の連結産物に等価の配列をもつ化学的に合成した 1 本鎖 50 量体を鎖型として用いて実施した。オリゴ C は 5' ビオチン化した。従って、鎖型は検出されなかった。予想通り、固定化して

ら得た。野生型及び突然変異対立遺伝子は標準 Sanger シーケンシングにより確認した。

CFTR 遺伝子のエキソン 10 の PCR 増幅

PCR 増幅用プライマーは CFEX10-F (イントロン 9 に位置し、ビオチン化した 5' -GCAAGTGAATCCTGAGCGTG-3' (配列番号 13)) 及び CFEX10-R (イントロン 10 に位置する 5' -GTGTGAA GGGCGTG-3' (配列番号 14)) とした。プライマーは 8 pmol の濃度で使用した。Taq-ポリメラーゼと 10×緩衝液は Boehringer-Mannheim から購入し、dTNP は Pharmacia から購入した。総反応容量は 50 µl とした。PCR のサイクリング条件は 5 分間 95℃ から開始後、1 分間 94℃、45 秒間 53℃ 及び 30 秒間 72℃ を 40 サイクル繰り返し、5 分間 72℃ の最終伸長時間とした。

増幅産物の精製

増幅産物は Qiagen の PCR 精製キット (No. 28106) を製造業者の指示に従って使用することにより精製した。TE 緩衝液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) 50 µl で精製物をカラムから溶離した。

2 本鎖 DNA のアフィニティ捕獲及び変性

ストレプトアビジンをコートしたマイクロタイタープレート (No. 1645684 Boehringer-Mannheim 又は No. 95029262 Labsystems) の 1 個のウェルに精製増幅産物の 10 µl アリコートをした。次いでインキュベーション緩衝液 (80 mM リン酸ナトリウム, 400 mM NaCl, 0.4% Tween 20, pH 7.5) 10 µl と水 30 µl を加えた。室温で 1 時間インキュベーション後、ウェルを洗浄用緩衝液 (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 8.8) 200 µl で 3 回洗浄した。2 本鎖 DNA を変性するために、ウェルを 50 mM NaOH 溶液 100 µl で 3 分間処理し、ウェルを洗浄用緩衝液 200 µl で 3 回洗浄した。

オリゴ塩基伸長反応

アニーリング用緩衝液 (20mM Tris, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 1% Triton X-100, pH8) 50μl で50℃で10分間25pmol 検出プライマー (CF508: 5'-CTATATTCATCATAGGAAACACCA-3' (配列番号15)) のアニーリングを実施した。ウェルを洗浄用緩衝液200μl で3回、TE緩衝液200μl で1回洗浄した。伸長反応はUSB製品DNAシーケンシングキット (No. 70770) の一部のコンポーネントとPharmacia製品dNTP又はddNTPを使用して実施した。総反応容量は45μlとし、水21μl、Sequenase緩衝液6μl、10mM DTT溶液3μl、0.5mMの3種のdNTP 4.5μl、2mM欠損ddNTP 4.5μl、グリセロール酵素希釈用緩衝液5.5μl、Sequenase2.00.25μl及びピロホスファターゼ0.25とした。反応溶液を氷上にビレットでとった後、15分間室温及び5分間37℃でインキュベートした。その後、ウェルを洗浄用緩衝液200μl で3回、70mM クエン酸NH₄溶液60μl で1回洗浄した。

伸長プライマーの変性及び沈殿

伸長したプライマーを10%DMSO (ジメチルスルホキシド) 水溶液50μl で80℃で10分間変性させた。沈殿のために、酢酸NH₄ (pH6.5) 10μl、グリコーゲン (10mg/ml水, Sigma No. G1765) 0.5μl 及び

び無水エタノール100μl を上清に加え、1時間室温でインキュベートした。13,000gで10分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、180mM/cmHz O水1μl に再懸濁した。

試料調製及びMALDI-TOFマスペクトロメトリーによる分析

試料調製はマトリックス溶液 (1:1 H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、0.07M二塩基性クエン酸アンモニウム) と再懸濁DNA/グリコーゲンペレット各0.3μl を試料ターゲット上で混合し、風乾するこ

の方法はΔ1507突然変異を明確に検出できるという利点もある。ddTTP反応では野生型対立遺伝子が検出され、ddCTP反応では3塩基対欠失が検出される。

本方法はDNAの単一点突然変異又は微小損傷の検出に非常に適している。突然変異検出プライマーを慎重に選択すると、多重化が可能になり、同等の対立遺伝子特異的手順で必要な厳密なストリンジエンシーを必要とすることなく遺伝診断で高スループットと高品質が得られる。遺伝情報の固有性により、突然変異検出プライマーのオリゴ塩基伸長は本明細書にも記載するように、可変数タンデムリピート (VNTR) 又は他の単一ヌクレオチド多型性 (例えばアポリポタンバク質E遺伝子) 等のゲノムで各疾患遺伝子又は多型性領域で適用可能である。

実施例8

マトリックス助剤レーザーデソープション/イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) マスペクトロメトリーによる7-デアザプリン部分を含むポリメラーゼ連鎖反応産物の検出

材料と方法

核酸増幅

以下のオリゴヌクレオチドプライマーは、標準ホスホロアミダイト化学 (Sinha, N. D. ら (1983) Tetrahedron Let. Vol. 24, Pp. 5843-5846; Sinha, N. D. ら (1984) Nucleic Acids Res. Vol. 12, Pp. 4539-4557) に従い、Milligen 7500 DNA Synthesizer (Millipore, Bedford, MA, 米国) で200nmol規模で合成するか、又はMWG-Biotech (Ebersberg, ドイツ、プライマー3) 及びBiometra (Goettingen, ドイツ、プライマー6~7) から購入した。

プライマー1: 5'-GTCACCTCGACCTGCAG (配列番号16);

プライマー2: 5'-TTGTAAACGACGGCCAGT (配列番号17);

により実施した。20個までの試料をプローブターゲットディスクにスポットして未改造Thermo Bioanalysis (旧Finnigan) Visions 2000 MALDI-TOFのソース領域に導入し、夫々ターゲット及び変換ダイノードで5及び20kVのリフレクトロンモードで運転した。理論平均分子量 (Mr (calc)) は原子組成から計算し、報告実測Mr (Mr (exp)) 値は外部校正を使用して決定した1プロトン化形態の値である。

結果

本実験の目的は、厳密なストリンジエンシーから独立した迅速で確実な突然変異検出方法を開発し、遺伝病の診断で高品質と高スループットを実現することであった。そこで、特殊なDNAシーケンシング (1個の突然変異検出プライマーのオリゴ塩基伸長) をマトリックス助剤レーザーデソープションイオン化 (MALDI) マスペクトロメトリー (MS) によるミニシーケンシング産物の評価と併用した。可能な質量測定システムとして飛行時間 (TOF) リフレクトロン構成を選択した。CFTR遺伝子のエクソン10の突然変異はコーカソイド集団で最も一般的な単一遺伝子疾患である嚕性線維症の臨床表現型を誘導することがあるので、この仮説を証明するために、CFTR遺伝子のエクソン10で試験を実施した。

図34に示す図は、CFTR遺伝子のエクソン10 (配列番号132) の野生型及び種々の突然変異の理論計算分子量をもつ短い予想シーケンシング産物を示す。短いシーケンシング産物はddTTP (図34A、配列番号133~135) 又はddCTP (図34B、配列番号136~139) を用いて初期DNA鎖に最終的配列関連停止配列を導入することにより生成

した。健康、突然変異ヘテロ接合及び突然変異ホモ接合個体のMALDI-TOF-MSスペクトルを図35に示す。全試料はマスペクトロメトリー分析との間に不一致を示さないことが標準Sangerシーケンシングにより確認された。種々の分子量の実測精度は予想範囲-21.8及び+87.1ダルトン (Da) の範囲内であった。従って、各場合に結果を確実に解釈することができる。こ

プライマー3: 5'-CTTCCACCGCGATGTGA (配列番号18);

プライマー4: 5'-CAGGAACAGCTATGAC (配列番号19);

プライマー5: 5'-GTAAACGACGGCCAGT (配列番号20);

プライマー6: 5'-GTCACCTCGACCTGCAGC (g:RibcG) (配列番号21);

プライマー7: 5'-GTTGTAAACGAGGCCAGT (g:RibcG) (配列番号22)。

99量体 (配列番号141) 及び200量体DNA鎖 (配列番号140、修飾及び未修飾) とリボ及び7-デアザプリン修飾100量体は、10mmol/L KCl、10mmol/L (NH₄)₂SO₄、20mmol/L Tris HCl (pH8.8)、2mmol/L MgSO₄、(exo (-) Pseudococcus furiosus (Pfu) 一級緩液)、Pharmacia, Freiburg, ドイツ)、0.2mmol/L各NTP (Pharmacia, Freiburg, ドイツ)、1μmol/L各プライマー及びexo (-) Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene, Heidelberg, ドイツ) 1単位を含む100μLの反応容量中でpRFcl DNA (10ng、ハンブルグ大学S. Feyerabend氏から寄贈) から増幅した。99量体にはプライマー1及び2、200量体にはプライマー1及び3、100量

体にはプライマー6及び7を使用した。7-デアザプリン修飾核酸を得るためには、PCR増幅中にdATPとdGTPを7-デアザ-dATPと7-デアザ-dGTPで置換した。反応は、サーマルサイクラー (OmniGene, MWG-Biotech, Ebersberg, ドイツ) で95℃で1分間変性、51℃で1分間アニーリング及び72℃で1分間伸長からなるサイクルを使用して実施した。全PCRで反応サイクル数は30とした。最終サイクル後に更に10分間72℃で反応物を伸長させた。

103量体DNA鎖 (修飾及び未修飾、配列番号245) は、プライマー4及び5を使用して100μL反応容量中で他の濃度は変えずにM13mp18RF1 DNA (100ng, Pharmacia, Freiburg, ドイツ) か

ら増幅した。反応は95℃で1分間変性、40℃で1分間アニーリング及び72℃で1分間伸長からなるサイクルを使用して実施した。夫々未修飾103量体では30サイクル、修飾103量体では40サイクル後に試料を更に10分間72℃でインキュベートした。

5' - [³²P] 標識PCRプライマーの合成

プライマー1及び4はT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Epicentre Technologies) と (γ-³²P) -ATP (BLU/NGG/502 A, Dupont, ドイツ) を製造業者のプロトコールに従って使用して5' - [³²P] 標識した。反応はPCRのプライマー1及び4の10%を標識プライマーに置換し、他の反応条件は変えずに実施した。増幅したDNAを10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動により分離した。適当なバンドを切り出し、Packard TRI-CARB 460 C液体シンチレーションシステム (Packard, CT, 米国) で計数した。

リボ修飾PCR産物からのプライマー分離

Ultrafree-MCフィルタユニット (30,000 NMWL) を使用して増幅DNAを精製した後、0.2 mol/L NaOH 100 μl に再溶解し、95℃に25分間加熱した。次に溶液をHCl (1 mol/L) で酸性化し、下記に記載するようにUltrafree-MCフィルタユニット (10,000 NMWL) を使用してMALDI-TOF分析のために更に精製した。

増幅産物の精製

全試料はUltrafree-MCフィルタユニット30000 NMWL (Millipore, Eschborn, ドイツ) を製造業者の指示に従って使用して精製及び濃縮した。凍結乾燥後、増幅産物を超純水5 μL (200量体は3 μL) に再溶解した。この分析物溶液をMALDI-TOF測定に直接使用した。

MALDI-TOF MS

ると、7-デアザプリンで修飾したプライマーのコストは非常に高いと思われる。従って、本方法の適用性と範囲を拡大するために、通常入手可能な未修飾オリゴヌクレオチドプライマーを使用して全PCRを実施した。ポリメラーゼ連鎖反応でdATP及びdGTPをc⁷-dATP及びc⁷-dGTPに置き換えると、99量体及び103量体では約80%、200量体では約90%の7-デアザプリン修飾ヌクレオチドを含む産物が得られた。表11は全PCR産物の塩基組成を示す。

表 11:

(未修飾及び7-デアザプリン修飾) 99量体、103量体及び200量体PCR増幅産物の塩基組成

| DNA フラグメント | C | T | A | G | c ⁷ -デアザ-A | c ⁷ -デアザ-G | 相対修飾率 ¹⁾ |
|---------------|----|----|----|----|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| 200量体 s | 54 | 34 | 58 | 56 | - | - | - |
| 修飾200量体 s | 54 | 34 | 6 | 5 | 50 | 51 | 90% |
| 200量体 a | 56 | 56 | 34 | 54 | - | - | - |
| 修飾200量体 a | 56 | 56 | 3 | 4 | 31 | 50 | 92% |
| 103量体 s | 26 | 23 | 24 | 28 | - | - | - |
| 修飾103量体 s | 26 | 23 | 6 | 5 | 18 | 23 | 79% |
| 103量体 a | 26 | 24 | 23 | 28 | - | - | - |
| 修飾103量体 a | 26 | 24 | 7 | 4 | 16 | 24 | 78% |
| 99量体 s | 34 | 21 | 24 | 20 | - | - | - |
| 修飾99量体 s | 34 | 21 | 6 | 5 | 18 | 15 | 75% |
| 99量体 a | 20 | 24 | 21 | 34 | - | - | - |
| 修飾99量体 a | 20 | 24 | 3 | 4 | 18 | 30 | 87% |

¹⁾ 「s」及び「a」は2本鎖増幅産物の「センス」及び「アンチセンス」鎖を表

分析物溶液0.5 μLとマトリクス溶液 (アセトニトリル/水 (1:1, v/v) 中0.7 mol/L 3-HPAと0.07 mol/Lクエン酸アンモニウム) 0.5 μLのアリコートを手軽な金属試料支持体上で混合した。周囲温度で乾燥後、試料をマスマスベクトロメーターに導入して分析した。使用したMALDI-TOFマスマスベクトロメーターはFinnigan MAT Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, ドイツ) とした。スベクトルは5 keVイオン源及び20 keV後加速で陽イオンリフレクターモードで記録した。装置は窒素レーザー (337 nm波長) を取り付けた。システムの真空度はアナライザー領域で3~4・10⁻⁸

hPaとし、ソース領域で1~4・10⁻⁷ hPaとした。修飾及び未修飾DNA試料のスベクトルは同一相対レーザー出力で得、合成オリゴデオキシヌクレオチド (7~50量体) の混合物で外部校正を行った。

結果と考察

7-デアザプリンヌクレオチドを含む核酸のPCRによる酵素合成

短い増幅産物の迅速な無ゲル分析にMALDI-TOF MSを利用できることを立証すると共に、MALDI-TOF条件下における核酸の7-デアザプリン修飾の効果を検討するために、2種の異なるプライマー-鎖型系を使用してDNAフラグメントを合成した。図36及び37に配列を示す。103量体増幅産物の2本の1本鎖はほぼ等しい質量であったが (Δm=8 u)、99量体の2本の1本鎖は526 uの差があった。化学DNA合成の7-デアザプリンヌクレオチド構成ブロックが通常のものよりも約160倍も高価であること (Product Information, Glen Research Corporation, Sterling, VA)、標準β-シアノホスホロアミダイト化学におけるその利用は自明

ではない (Product Information, Glen Research Corporation, Sterling, VA; Schneiderら (1995) Nucl. Acids Res. 23:1570) ことを考慮す

す。

²⁾ プリンヌクレオチドの合計量に対する7-デアザプリン修飾ヌクレオチドの百分率として相対修飾率を示す。

80~90%の7-デアザプリン修飾率が正確なマスマスベクトロメリー検出に十分であるか否かは判断できなかった。そこで、酵素増幅段階中に全プリンヌクレオチドを置換できるか否かを判断することが重要であった。Taq DNAポリメラーゼを使用する場合にPCRでdATPをc⁷-dATPに完全に置き換えられないことは報告されていた (Seela, F. とA. Roelling (1992) Nucleic Acids Res., 20, 55-61) ので、これは自明ではなかった。幸運なことに、exo (-) Pfu DNAポリメラーゼは未修飾プリンヌクレオチド三リン酸の不在下で実際にc⁷-dATP及びc⁷-dGTPを受容することが判明した。取り込みは低率であったので、増幅産物の収率は低かった (図38)。

これらの結果を確認するために、[³²P] 標識プライマーによる増幅を繰り返した。オートラジオグラム (図39) は修飾PCR産物のほうが収率が低いことを明示している。ゲルからバンドを切り出し、計数した。全増幅産物で修飾核酸の収率は対応する未修飾増幅産物に対して約50%であった。更に実験を続けた結果、exo (-) Deep Vent及びVent

DNAポリメラーゼもPCR中にc⁷-dATPとc⁷-dGTPを取り込めることが判明した。しかし、総性能は、増幅中の副生物が最も少なかったexo (-) Pfu DNAが最良であることが判明した。全3種のポリメラーゼを使用した処、等電子体でなくc⁷-dATPとc⁷-dGTPを使用したこれらのPCRは副反応が少なく、よりクリーンなPCR産物を生じることが判明した。増幅副生物が生じにくいことは、PCR中に合成される長い鎖型によるプライマーミスマッチの低下により説明できる。7-デアザプリンを含むDNAデュプレックスの融点が高いことは既に記載されている (Mizusawa, W. ら, (1986) Nucleic Acids Res., 14, 1319-1324)。上記

3種のポリメラーゼ(exo(-) Deep Vent DNAポリメラーゼ、5 Vent DNAポリメラーゼ及びexo(-) (Pfu) DNAポリメラーゼ) 以外に、大腸菌DNAポリメラーゼ、Sequenase、Taq DNAポリメラーゼ及びU Ampli Taq DNAポリメラーゼの大きいKlenowフラグメント等の他のポリメラーゼも利用できると予想される。更に、RNAが鋳型である場合には、SP6又はT7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼを使用しなければならない。

修飾及び未修飾増幅産物のMALDI-TOFマスペクトロメトリ

99量体、103量体及び200量体増幅産物をMALDI-TOF MSにより分析した。過去の実験によると、脱プリン度は分析物の脱着及びイオン化に使用するレーザーエネルギーに依存することが知られていた。脱プリンによる断片化に及ぼす7-デアザプリン修飾の影響は検討されていないので、全スペクトルを同一相対レーザーエネルギーで測定した。

図40a及び40bは修飾及び未修飾103量体核酸の質量スペクトルを示す。修飾103量体の場合には断片化が広い(M+H)⁺・シグナルを生じている。ピークの最大値は低質量にシフトしており、帰属質量は(M+H)⁺・シグナル自体でなく(M+H)⁺・シグナルと断片化イオンのシグナルの平均値に相当する。修飾103量体はオリゴヌクレオチドプライマーからのA及びGをまだ約20%含んでいるが、シグナルが著しく狭く対称になっていることから断片化が少ないことを示している。特に脱プリンによる低質量側にテールをもつピークは実質的に減っている。従って、予想質量よりはるかに低いものの、測定質量と計算質量の差は非常に小さくなっている。未修飾試料では、

計算質量との差が97u又は0.3%で31670に(M+H)⁺・シグナルが観察された。他方、修飾試料の場合にはこの質量差は10u又は0.03%に減った(実測値31713u、計算値31723u)。これらの観測は2本の1本鎖の(M+H)⁺・シグナルの質量分解能の著しい増加により裏付けられる(Δm =半最大値の全幅fwhmとしたときに $n/\Delta m=67$ 、未修飾試料では18)。

うに修飾プライマーは不適合を伴うので、リボ修飾をもつプライマーを使用して100量体を合成した。本発明者らの研究所で先に開発した方法に従ってプライマーをNaOHで加水分解した(Koester, H.ら, Z Physiol. Chem., 359, 1570-1589)。図43A及び43Bはプライマー開裂前後の増幅産物のスペクトルを示す。図43bは加水分解に成功したことを示す。加水分解増幅産物と2種の遊離プライマーを残留未開裂100量体からの小さいシグナルと共に検出することができた。プライマーに由来する未修飾プリンの割合は増幅配列の長さが短くなるにつれて増加するので、この方法は非常に短いPCR産物のMALDI-TOF分析に特に有用である。

7-デアザプリンで修飾した核酸の優れた性質は、より効果的な脱着及び/又はイオン化、イオン安定性の増加及び/又は2本鎖プリン修飾核酸の変性エネルギーの低下により説明することができる。メチル基のN-7を交換する結果、水素結合の受容体が1個減り、核酸が非ワトソン・クリック塩基対合による二次構造を形成する能力が変化する(Seela, F.とA. Kehne(1987) Biochemistry, 26,

2232-2238)。これに加え、7-デアザプリンの芳香族系は電子密度が低く、ワトソン・クリック対合を弱めるので、2本鎖の融点が低下する(Mizusawa, S.ら, (1986) Nucleic Acids Res., 14, 1319-1324)。この効果により、MALDIプロセスでデュプレックスの変性に必要なエネルギーが低減と思われる。これらの側面と、N-7窒素上に正電荷をもつと予想される部位の損失により、7-デアザプリン修飾核酸は低塩性になり、脱着効果が増すと思われる。

プロトン受容体としてのN-7の不在と7-デアザプリンヌクレオチドにおけるC-N結合の分極の低下により、溶液中の加水分解に認められているメカニズムによる脱プリンが避けられる。溶液及び気相中の反応の直接相関は問題があるが、MALDIプロセスでは修飾核酸の脱プリンによる断片化が少ないと予想することができる。脱プリンは電荷の損失により電荷種の結効率を低下させたり、あるいは電荷をもつ断片化産物を生じ、非断片化分子イオンシグナルの強度を低

2本の1本鎖の質量差が小さい(5u)ため、各シグナルは分解しなかった。

99塩基対DNAフラグメントの結果によると、7-デアザプリンを含むDNAの質量分解能増加の効果は一層明白になる。プリンとピリミジンの分布が不均一であるために増幅産物の2本の鎖の質量差が526uと非常に大きいにも拘わらず、未修飾試料の2本の1本鎖は分解しなかった(図41a)。これに対して、修飾DNAは2本の1本鎖に異なるピークを示し(図41b)、分子量を測定するためにこのアプローチがゲル電気泳動法よりも著しく優れていることを立証している。基線分解は得られなかったが、各質量を0.1%の精度即ち1鎖では $\Delta m=27u$ (計算質量=30224u)、H鎖では $\Delta m=14u$ (計算質量=30750u)で帰属させることができた。ま

た、7-デアザプリンを含む試料では半最大値の全幅が実質的に減少することが判明した。

99量体と103量体の場合には、7-デアザプリンを含む核酸はまだ約20%の未修飾プリンヌクレオチドを含んでいるという事実にも拘わらず、高い感度を与えらる。同等の(M+H)⁺・シグナルの強度で同等のシグナル対ノイズ比を得るためには、未修飾99量体は20回のレーザー照射が必要であるが、修飾99量体では12回であり、未修飾試料の103量体は12回必要であるが、7-デアザプリンヌクレオチドを含む増幅産物の103の量体では3回である。

修飾及び未修飾200量体アンプリコンのスペクトルを比較すると、この場合も7-デアザプリンを含む試料では質量分解能の改善とシグナル強度の強化が判明した(図42A及び42B)。修飾試料のスペクトルには1本鎖のシグナルが優勢であるが、未修飾試料では1本鎖のDNAデュプレックスと2量体が最強のシグナルを与えた。

PCRで修飾プライマーを使用するか又は部分的に修飾した増幅産物から未修飾プライマーを分離することにより核酸の完全な7-デアザプリン修飾を実施することができる。上述のよ

下させると考えられる。

7-デアザプリンを含む試料の断片化の低下による感度の増

加と低質量側の(M+H)⁺・シグナルのピークテーリングの低下は、MALDI-TOFプロセスにおける脱プロセスのメカニズムに実際にN-7原子が不可欠であることを示している。結論として、7-デアザプリンを含む核酸はMALDI-TOF条件下で顕著なイオン安定性と感度の増加を示し、従って、高い質量精度と質量分解能を提供する。

実施例9

固相シーケンシング及びマスペクトロメーター検出

材料と方法

オリゴヌクレオチドはOperon Technologies (Alameda, CA) から未精製形態で調製した。シーケンシング反応はSequenase Version 2.0 (Amersham, Arlington Heights, Illinois) 用シーケンシングキットからの試薬を使用して固相で実施した。

39量体ターゲットのシーケンシング

シーケンシング複合体:

| 配列 | 配列番号 |
|---|------|
| 5'-TCTGGCCTGGTGCAGGGCCTATTGTAGTTGTACGTACA-(A') ₃ ' | 23 |
| 5'-TGTCAGTCACAACCT-3'(PNA16/DNA) | 24 |

固相Dシーケンシングを実施するために、鋳型鎖DNA11683を末端デオキシヌクレオチルトランスフェラーゼにより3'-ビオチン化した。DNA11683 60pmol、ビオチン14-dATP (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 1.3nmol、末端トランスフェラーゼ (Amersham, Arlington Heights, Illinois) 30単位及び1×反応緩衝液(酵素を含む)を含む反応混合物30μlを37℃で1時間インキュベートした。末端トランスフェラーゼを70℃で10分間熱不活化

—31—

| | A- 反座 | C- 反座 | G- 反座 | T- 反座 |
|-----|---------|---------|---------|--------|
| 1. | | | | |
| 2. | 4223.8 | 4223.8 | 4223.8 | 4223.8 |
| 3. | 4521.1 | | | |
| 4. | | 4809.2 | | |
| 5. | 6133.4 | | | |
| 6. | 5434.6 | | | |
| 7. | | | | 5737.8 |
| 8. | 6051.1 | | | |
| 9. | | | 6379.2 | |
| 10. | | | 6704.4 | |
| 11. | | 6995.6 | | |
| 12. | | 7284.8 | | |
| 13. | | 7574.0 | | |
| 14. | | | | 7678.2 |
| 15. | | | 8207.4 | |
| 16. | | 8495.6 | | |
| 17. | 8808.8 | | | |
| 18. | | 9097.0 | | |
| 19. | | 9388.2 | | |
| 20. | 9899.4 | | | |
| 21. | | | 10027.6 | |
| 22. | | | 10355.8 | |
| 23. | | 10644.0 | | |
| 24. | | 10933.2 | | |
| 25. | 11246.4 | | | |
| 26. | | | 11574.6 | |
| 27. | 11886.8 | | | |

-32-

| | |
|----|--|
| 37 | 3'-GCCAATGCGACTAGCAGCAGACGACGACGACCTACTAGCGTGGGTATGC-5' |
| 38 | 3'-AGCCATTGGCACTGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 39 | 3'-ANGCCAATCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGCGTGCGTAGTC-5' |
| 40 | 3'-TAAGCCAAATCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 41 | 3'-TAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGCGTGCGTAGTC-5' |
| 42 | 3'-CCTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 43 | 3'-CCTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 44 | 3'-TGCTTAAGCCAAATCGCATGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 45 | 3'-GTGCTTAAGCCAAATCGCATGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 46 | 3'-GDTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 47 | 3'-TBTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 48 | 3'-CTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 49 | 3'-ACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 50 | 3'-GACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 51 | 3'-AGACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 52 | 3'-TAGACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 53 | 3'-CTAGACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 54 | 3'-TTAGACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |
| 55 | 3'-TTTAGACTGTTGCTTAAGCCAAATGCGCATGACGACGACGACGACGACGACGACCTACTABGCTGCGTAGTC-5' |

| | ddATP | ddCTP | ddGTP | ddTTP |
|-----|---------|----------|---------|--------|
| 1. | 5491.6 | 5491.6 | 5491.6 | 5491.6 |
| 2. | | 5764.8 | | |
| 3. | 6078.0 | | | |
| 4. | | | 6407.2 | |
| 5. | | 6698.4 | | |
| 6. | 7009.6 | | | |
| 7. | | | 7338.8 | |
| 8. | | 7628.0 | | |
| 9. | 7941.2 | | | |
| 10. | | | 8270.4 | |
| 11. | | 8559.6 | | |
| 12. | 8872.8 | | | |
| 13. | | | 9202.0 | |
| 14. | | 9491.2 | | |
| 15. | 9804.4 | | | |
| 16. | | | 10133.6 | |
| 17. | | 10422.88 | | |
| 18. | 10738.0 | | | |
| 19. | | | 11065.2 | |
| 20. | | 11354.4 | | |
| 21. | 11667.6 | | | |
| 22. | | | 11996.8 | |
| 23. | | 12286.0 | | |
| 24. | 12599.2 | | | |

| | | | | |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 25. | | | 12928.4 | |
| 26. | | | | 13232.6 |
| 27. | | 13521.8 | | |
| 28. | 13835.0 | | | |
| 29. | | 14124.2 | | |
| 30. | | | 14453.4 | |
| 31. | | 14742.6 | | |
| 32. | | | | 15046.8 |
| 33. | 15360.0 | | | |
| 34. | 15673.2 | | | |
| 35. | | 15962.4 | | |
| 36. | | 16251.6 | | |
| 37. | | | 16580.8 | |
| 38. | 16894.0 | | | |
| 39. | 17207.2 | | | |
| 40. | | | | 17511.4 |
| 41. | | 17800.6 | | |
| 42. | | 18189.8 | | |
| 43. | | 18379.0 | | |
| 44. | | | | 18683.2 |
| 45. | | | 19012.4 | |
| 46. | | | 19341.6 | |
| 47. | | | | 19645.8 |
| 48. | | 19935.0 | | |
| 49. | 20248.2 | | | |
| 50. | | | 20577.4 | |

| | | | | |
|-----|---------|---------|--|---------|
| 51. | 20890.6 | | | |
| 52. | | | | 21194.4 |
| 53. | | 21484.0 | | |
| 54. | | | | 21788.2 |
| 55. | | | | 22092.4 |

捕獲及びプライミング用デュプレックスDNAプローブを使用するシーケンシング

1本鎖オーバーハングをもつデュプレックスDNAプローブは特定DNA鎖型を捕獲することができ、固相シーケンシング用プライマーとして利用できることが立証されている。スキームを図46に示す。デュプレックスプライマーと1本鎖鎖型のスタッキング相互作用により、5塩基のオーバーハングだけで捕獲に十分である。このフォーマットに基づき、5塩基オーバーハングを残して5'蛍光標識23量体(5'-GAT GAT CCG ACG CAT CAC AGC TC-3') (配列番号29)を3'ビオチン化18量体(5'-GTG ATG CGT CGG ATC ATC-3') (配列番号30)にアニールした。15量体鎖型(5'-TCG GTT CCA AGA GCT-3') (配列番号31)をデュプレックスにより

捕獲し、5塩基オーバーハングの伸長によりシーケンシング反応を実施した。反応産物のMALDI-TOF質量スペクトルを図47A~Dに示す。全シーケンシングピークは比較的低強度ではあったが分解した。各反応の最後のピークは、Sequenase酵素により全長伸長産物に1個のスクレオチドが非特異的に付加されたためである。比較のために、同一産物を慣用DNAシーケンサーで試験し、結果のスタッキングフルオログラムを図48に示す。同図から明らかなように、質量スペクトルは23量体プライマーよりも著しく低強度のシーケンシングピークをもつフルオログラムと同一パターンであった。

実施例10

サーモシーケナーゼサイクルシーケンシング

材料と方法

、30秒間55℃を35サイクル繰り返し、2分間72℃の最終伸長とした。

試料調製及びMALDI-TOF MSによる分析。サイクリングプログラムの完了後、H₂O 25 µlを加えて反応容量を50 µlまで増量した。アンモニウム飽和DOWEX (Fluka #44485) カチオン交換ビーズ30 µlを分析物50 µlと共に2分間室温で震盪することにより脱塩を行った。プロトン化形態で購入したDowexビーズは2M NH₄OHで前処理してアンモニウム形態に変換後、上清が中性になるまでH₂Oで洗浄し、最後に10 mMクエン酸アンモニウムに加えて使用した。カチオン交換後、DNAを精製し、3M酢酸ア

ンモニウム(pH6.5) 5 µl、グリコーゲン(10 mg/ml, Sigma) 0.5 µl及び無水エタノール110 µlを分析物に加えてエタノール沈殿により濃縮し、室温で1時間インキュベートした。20,000×gで12分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18 Mohm/cm H₂O水1 µlに再懸濁した。

MALDI-TOF MS分析のために、再懸濁したDNA 0.35 µlをステンレス鋼試料ターゲットディスク上でマトリックス溶液(1:1 H₂O:C H₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸(3-HPA)、0.7Mクエン酸アンモニウム) 0.35~1.3 µlと混合し、風乾後、Thermo Bioanalysis Vision 2000 MALDI-TOFをターゲット及び変換ダイノード5 kV及び20 kVのリフレクトロンモードで運転してスペクトルを測定した。8個のピーク(3000~18000 Da)から生成した外部校正を全スペクトルに使用した。

結果

図49は鎖型として生物増幅産物と12量体(5'-TGC ACC TGA CTC-3') (配列番号34)シーケン

シングプライマーから生成したシーケンシングラダーのMALDI-TOF質量スペクトルを示す。脱プリンに起因するピークと配列に無関係のピークをアステ

特表2002-507883

PCR増幅。ヒト白血球ゲノムDNAをPCR増幅に使用した。β-グロビン遺伝子の209 bpフラグメントを増幅するためのPCRプライマーとしては、β2順プライマー(5'-CAT TTG CTT CTG ACA CAA CTG-3')、配列番号32)とβ11逆プライマー(5'-CTT CTC TGT CTC CAC ATG C-3')、配列番号

33)を使用した。Taq-ポリメラーゼと10×緩衝液はBoehringer-Mannheim (ドイツ)から購入し、dNTPはPharmacia (Freiburg, ドイツ)から購入した。総反応容量は50 µlとし、各プライマー8 pmol、鎖型として使用したゲノムDNA約200 ng及び最終dNTP濃度200 µMとした。PCR条件は、5分間94℃の後、30秒間94℃、45秒間53℃、30秒間72℃を40サイクル繰り返し、最終伸長時間2分間72℃とした。生成した増幅産物をQiagen "Qiaquick" PCR増幅キット(#28106)で精製及び濃縮し(2×)、H₂O中に保存した。

サイクルシーケンシング。下記条件でThermo Sequenase (登録商標)-DNA Polymerase (Amersham Life Science, #E79000Y)を用いてプライマー伸長によりシーケンシングラダーを生成した。即ち、総容量25 µl中精製濃縮増幅産物6 µl (即ち元の増幅産物12 µl)、Thermo Sequenase 2.5単位及びThermo Sequenase反応緩衝液2.5 mlにHPLC精製プライマー (Cad5 12量体:

5'-TGC ACC TGA CTC-3', 配列番号34) 7 pmolを加えた。最終スクレオチド濃度は適当なddNTP (ddATP、ddCTP、ddGTP又はddTTP; Pharmacia Biotech, #27-2045-01) 30 µMと各dNTP (7-デアザ-dATP、DCTP、7-デアザ-dGTP、dTTP; Pharmacia Biotech) 210 µMとした。

サイクリング条件は4分間94℃で変性後、30秒間94℃、30秒間38℃

リスクにより示す。MALDI-TOF MS測定はリフレクトロンTOF MSで行った。A.) ddATPで停止したシーケンシングラダー; B.) ddCTPで停止したシーケンシングラダー; C.) ddGTPで停止したシーケンシングラダー; D.) ddTTPで停止したシーケンシングラダー。

図50は図49で生成したシーケンシングラダーと、プライマーから40塩基までの対応する計算分子量を示す(配列番号221~260)。計算には、プライマー3581.4 Da、7-デアザ-dATP 312.2 Da、dTTP 304.2 Da、dCTP 289.2 Da及び7-デアザ-dGTP 328.2 Daの分子量を使用した。

図51はシーケンシング用鎖型として使用したβ-グロビン遺伝子内の増幅209 bp増幅産物(配列番号261)の配列を示す。適当なPCRプライマーの配列と12量体シーケンシングプライマーの位置も示す。この配列はプライマーから4位後のホモ接合突然変異体に対応する。野生型配列では、このT

はAに置き換えられる。

実施例11

オリゴ塩基伸長(PROBE)とMALDI-TOFマスペクトロメトリーを使用するマイクロサテライト分析

要約

本方法は単一検出プライマーを使用後、オリゴスクレオチド伸長段階を実施し、MALDI-TOFマスペクトロメトリーにより容易に分解可能な長さで反復単位数又は反復領域内の第2の部位突然変異に特異的な塩基数だけ長さの異なる産物を生成する。ヒト染色体21に位置するインターフェロニン-αレセプター遺伝子のイントロン5におけるAluVP A多型性と、ヒト染色体7に位置するCFTR遺伝子からのイントロン8のスプライス受容部位のポリトラクトをモデルシステムとして使用して本方法を説明する。

材料と方法

ゲノムDNAは18人の無関係の個体と、母親、父親及び3人の子供からなる1家族から得た。反復領域を変性ゲル電気泳動により常法で評価し、得られた結

果を標準 Sanger シーケンシングにより確認した。

PCR増幅用プライマー（各8 pmol）は、インターフェロン- α レセプター遺伝子のイントロン5の一部にはIFNAR-1VS5-5' : (5' -TGCTTA CTT AAC CCA GTG TG-3'、配列番号35)とIFNAR-1VS5-3' : (5' -CAC ACT ATG TAA TAC TAT GC-3'、配列番号36)を使用し、CFTR遺伝子のフランキンゲンイントロン配列をもつCFTRエキソン9には(5' -ビオチン化)CFEx9-F : (5' -GAA AAT ATC TGA CAA ACT C ATC-3'、配列番号37)とCFEx9-R : (5' -CAT GGA CAC CAA ATT AAG TTC-3'、配列番号38)を使用した。Taq-ポリメラーゼと10×緩衝液はBoehringer-Mannheimから購入し、dNTPはPharmaciaから購入した。総反応容量は50 μ lとした。PCR条件は5分間94℃の後、1分間94℃、45秒間53℃及び30秒間72℃を40サイクル繰り返し、5分間72℃の最終伸長時間とした。

QiagenのPCR精製キット（No. 28106）を製造業者の指示に従って使用して増幅産物を精製した。TE緩衝

液（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5）50 μ lで精製物をカラムから溶離した。

A) プライマーオリゴ塩基伸長反応（熱サイクリング法）

精製鋳型1 pmol、Thermosequenase（Amersham Life Science, Cat. #E79000Y）2単位、Thermosequenase緩衝液2.5 μ l、各デオキシヌクレオチド25 μ mol（7-デアザ-dATP、dTTP及び実験により付加的dCTP）及びジデオキシグアニン100 μ mol及び実験により付加的dCTPを含む総容量25 μ l中で適当な検出プライマー（IFN: 5' -TGA GAC TCT GTC TC-3'、配列番号39）5 pmolを使用してサイクルPROBEを実施した。サイクリング条件は5分間94℃の初期変性後、30サイクル30秒間44

℃及び5分間37℃でインキュベートした。最後に、ウェルを洗浄用緩衝液B 200 μ lで3回洗浄した。

伸長したプライマーを50mM水酸化アンモニウム溶液50 μ l中で80℃に10分間加熱することにより鋳型鎖から変性させた。

沈殿のために、3M酢酸NH₄（pH6.5）10 μ l、グリコーゲン（10 mg/ml水、Sigma Cat. #G1765）0.5 μ l及び無水エタノール110 μ lを上清に加え、1時間室温でインキュベートした。13,000 gで10分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18Mohm/cmH₂O水1 μ lに再懸濁した。

試料調製はマトリックス溶液（1:1 H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、0.07M二塩基性クエン酸アンモニウム）0.6 μ lを再懸濁DNA/グリコーゲンペレット0.3 μ lと試料ターゲット上で混合し、風乾することにより実施した。20個までの試料をプローブターゲットディスクにスポットし、Thermo Bioanalysis (旧Finnigan) Versions 2000 MALDI-TOFのソース領域に導入し、夫々ターゲット及び変換ダイノード5及び20kVのリフレクトロンモードで運転した。理論平均分子量（M_r（calc））は原子組成から計算し、報告実測M_r（M_r（exp））値は外部校正を使用して決定した1プロトン化形態の値である。

結果

本実験の目的は、多型性領域内の第2の部位突然変異の検出能を含め、マイクロサテライト中の反復単位数又はモノヌクレオチド配列の長さを正確に決定するための迅速で確実な方法を開発することであった。そこで、特殊なDNAシーケンシング（プライマーオリゴ塩基伸長、PROBE）をマトリックス助剤レーザーデソープションイオン化（MALDI）マスマスベク

トロメトリー（MS）による産物の評価と併用した。可能な質量測定システムとして飛行時間（TOF）リフレクトロン構成を選択した。初期可用性試験として、まずヒトインターフェロン- α レセプター遺伝子のイントロン5に位置するA

特表2002-507883

でのアニーリング温度と1分間94℃の伸長温度とした。

プライマーオリゴ塩基伸長反応（等温法）

ストレプトアビジンをコートしたマイクロタイタープレートウェル（50 μ l容量当たり~16 pmol容量；No. 1645684 Boehringer-Mannheim）に精

製2本鎖増幅産物の10 μ lアリコート（~3 pmol）を移した後、インキュベーション用緩衝液（80mMリン酸ナトリウム、40mM NaCl, 0.4% Tween 20, pH7.5）10 μ lと水30 μ lを加えた。1時間室温でインキュベーション後、ウェルを洗浄用緩衝液A（40mM Tris, 1mM EDTA, 50mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH8.8）200 μ lで3回洗浄し、50mM NaOH 100 μ lと共に3分間インキュベートし、2本鎖Dを変性させた。最後に、ウェルを70mMクエン酸アンモニウム溶液200 μ lで3回洗浄した。

アニーリング用緩衝液（50mMリン酸アンモニウム緩衝液, pH7.0及び100mM塩化アンモニウム）50 μ l中で65℃で2分間、37℃で10分間及び室温で10分間検出プライマー（CFpT: 5' -TTC CCC AAA TCC CTG-3'、配列番号40）100 pmolのアニーリングを行った。ウェルを洗浄用緩衝液B（40mM Tris, 1mM EDTA, 50mM NH₄Cl, 0.1% Tween 20, pH8.8）200 μ lで3回、TE緩衝液200 μ lで1回洗浄した。USB製DNAシーケンシングキット（No.

70770）の一部の成分とPharmacia製dNTP又はddNTPを使用して伸長反応を実施した。総反応容量は45 μ lとし、水21 μ l、Sequenase緩衝液6 μ l、100mM DTT溶液3 μ l、7-デアザ-dATP 50 μ mol、ddCTP 20 μ mol、グリセロール酵素希釈用緩衝液5.5 μ l、Sequenase 2.0 0.25 μ l及びピロホスファターゼ0.25 μ lを含むものとした。反応産物を氷上にピペットでとった後、15分間

1 μ l VpA反復多型性（サイクルPROBE反応）、次にヒトCFTR遺伝子のイントロン8に位置するポリTトラクト（等温PROBE反応）で試験を行った。

AluVpA反復多型性のサイクルPROBE実験の模式図を図52に示す。センス鎖を鋳型として使用してアンチセンス鎖（配列番号262）の伸長を実施した。検出プライマーを下線で示す。家族試験では、電気泳動法とサイクルPROBE法の実施後、マスマスベクトロメトリー分析により種々の対立遺伝子の共変性分離を立証することができた（図53）。母親と子供2の対立遺伝子は、増幅産物の直接電気泳動によると2コピーのうちの一方が13個の反復単位をもつと思われたが、ddGをターミネーターとしてサイクルPROBEで測定すると11単位しかもたないことが判明した。ddGをddCに置き換えると、母親と子供2のDNAには約11650の分子量をもつ別の予想外の短い対立遺伝子が検出された（図54）。配列分

析によると、13反復単位をもつ対立遺伝子には2つの第2の部位突然変異の存在が確認された。一方は3番目の反復単位のC→T転位であり、第2の突然変異は9番目の反復単位のT→G転位である。28人の無関係個体の試験によると、13単位対立遺伝子はサイクルPROBEを使用すると正常対立遺伝子と切断対立遺伝子にスプライスされる。統計評価によると、多型性はどちらの方法でもハーディ・ワインベルグ平衡状態にあるが、検出法としてサイクルPROBEを使用すると、多型性情報頻度は0.734まで増加する。

更にPROBEを等温法として使用し、CFTR遺伝子のイントロン8スプライス受容部位（配列番号263）における3種の一般的な対立遺伝子を検出した。図55は予想診断産物（配列番号264~266）と理論質量値を示す。反応はアンチセンス方向でも実施した。

図56は、この遺伝子座における全3個の一般的な対立遺伝子（夫々T5、T7及びT9）をこの方法により確実に検出できたことを立証している。図56から明らかなように、この試験で使用したリフレクトロン飛行時間の質量正確度及び精度は0~0.4%であり、相対標準偏差0.13%であった。これは

IFNARシステムで生成される<90量体の産物の単塩基精度よりも遙かに良好である。このような高い分析感度は90量体に>1%質量シフトを誘導する反復単位又はそのフランキング領域内で単一又は多重挿入/欠失突然変異を検出するために十分である。これは図56のポリトトラクト分析でも同様である。早期産物ターミネーションを生じない他の突然変異(即ちIFNAR遺伝子A3T反復内のA→T又はT→A突然変異)はdNTP/ddNTPとPROBE及び低性能MS装置をどのように組み合わせても検出することができず、90量体の9Daシフトは0.03%質量シフトに対応する。100量体まで一桁のDa精度が得られるフーリエ変換(FT)MS等の高性能装置では、このような微量質量シフトを検出するために必要な正確度及び精度を達成できることが立証されている。更に、質量シフトしたフラグメントを装置内で単離及び解離し、配列特異的フラグメントを生成することができるタンデムFTMSは、同等寸法の産物で塩基の点突然変異を位置決定できることが立証されている。従って、PROBEを高性能装置と組み合わせると、反復領域の完全シーケンシングといった手間のかかるに作業によってしか達成できないような分析感度が得ら

れよう。

実施例12

プライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)とMALDI-TOFマスペクトロメトリーを使用するアポリボタンパク質Eの遺伝子型別の改善

材料と方法

PCR増幅。

従来公表されている文献(Braun, Aら, (1992) Human Genet. 89:401-406)による100人の匿名個体からのヒト白血球ゲノムDNAについて常法によりアポリボタンパク質Eをスクリーニングした。アポE遺伝子のエキソン4の一部を増幅するためのPCRプライマーは公表配列に従って作製した(Das, HKら, (1985) J. Biol. Chem. 260:6240-6247)(順プライマー、アポE-F:5'-GGC ACG GCT GTC CAA GGA G-3'、配列番号41;逆、アポE-R

ブトアピジンをコートした磁性ビーズに固定化した精製ビオチン化アンチセンス鎖型~1pmol、Thermosequencase 2.5単位、Thermosequencase緩衝液2μl、各dNTP50μM及びddXTP200μM(N及びXの塩基種は本文に記載する通りである)を含む20μl中で増幅産物35μlとコドン112(5'-GCG GAC ATG GAG GAC G AG-3'配列番号43)及び158(5'-GAT GCC GAT GAC C TG CAG AAG-3'配列番号44)

検出プライマー各8pmolを使用して多重熱PROBEを実施した。サイクリング条件は変性(94℃、30秒間)後、94℃(10分間)と60℃(45秒間)を30サイクルとした。

試料調製及びMALDI-TOF MSによる分析。

消化産物とPROBE産物の沈殿(Stultsら, (1991) Rapid Commun. Mass Spectrom. 5:359-363)のために、3M酢酸アンモニウム(pH6.5)5μl、グリコーゲン(10mg/ml, Sigma)0.5μl及び無水エタノール110μlを分析物溶液50μlに加え、室温で1時間保存した。13,000×gで10分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18Mohm/cm H₂O水1μlに再懸濁した。本実験では、アンモニウム飽和DOWEX(Fluka #44485)カチオン交換ビーズ10~20μlを分析物40μlに加えて費過することにより更に脱塩した。プロトン化形態で購入したビーズは2M NH₄OHで5分間スピンドカント段階を3回実施した後、H₂Oと10mMクエン酸アンモニウムで前処理した。

再懸濁したDNA0.35μlをステンレス鋼試料ターゲット

トディスク上でマトリックス溶液(Wuら(1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7:142-146)(1:1H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸(3-HPA)、0.07Mクエン酸アンモニウム)0.35~1.3μlと混合して風乾後、Thermo Bi

特表2002-507883

:5'-AGG CCG CGC CG GCG CCC TC-3'、配列番号42)。Taq-ポリメラーゼと10×緩衝液はBoehringer-Mannheim(ドイツ)

から購入し、dTNPはPharmacia(Freiburg,ドイツ)から購入した。総反応容量は50μlとし、各プライマー8pmol、10%DMSO(ジメチルスルホキシド、Sigma)及び鋳型として使用したゲノムDNA約200ngを含むものとした。1Uポリメラーゼを加える前に溶液を80℃まで加熱した。PCR条件は2分間94℃の後、30秒間94℃、45秒間63℃及び30秒間72℃を40サイクル繰り返し、72℃で2分間の最終伸長時間とした。

制限酵素消化及びポリアクリルアミド電気泳動。

CfoI及びRsaIと反応用緩衝液はBoehringer-Mannheimから購入し、HhaIはPharmacia(Freiburg,ドイツ)から購入した。CfoI単独及びCfoI/RsaI同時消化では、増幅産物20pLを水15μlとBoehringer-Mannheim緩衝液4pLで希釈し、適当な制限酵素10単位の添加後、試料を60分間37℃でインキュベートした。HhaI/RsaI同時消化操作では、まず緩衝液中でRsaIで1時間消化後、NaCl(終濃度50mM)とHhaIを加えて更に1時間インキュベーションが必要であった。他の文献(Hixson

(1990) J. Lipid Res. 31:545-548)に記載されているように12%ポリアクリルアミドゲル上で制限消化産物20pLを分析した。RsaIとCfoI(HhaI)の認識配列は夫々GT/AC及びGCG/Cであり、252量体増幅産物のCfoI単独及びCfoI(又はHhaI)とRsaIの同時二重消化による予想消化フラグメントの質量を表Vに示す。

熱PROBE。

増幅産物をQiagen "Qiaquick"キットで精製し、取り込まれなかったプライマーを除去した以外は上記と同様にPCR増幅を実施した。ストレ

oanalysis Vision 2000 MALDI-TOFをターゲット及び変換ダイノード夫々5及び20kVのリフレクトロンモードで運転してスペクトルを測定した。フラグメントの理論平均分子量(M_r(calc))は原子組成から計算し、実測分子量(M_r(exp))は組データ値からプロトンの質量(1.08Da)を差し引き、中性基準で報告する。8個のピーク(3000~18000Da)から生成した外部校正を全スペクトルに適用した。

結果

CfoI単独消化。

図57aの挿入図は252bpアポE増幅産物のCfoI消化後のe3/e3遺伝子型の12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動分離を示す。電気泳動バンドを分子量ラダーと比較すると、切断パターンはe3/e3遺伝子型にほぼ予想される通り

(表V)である。相違点として、約25bpの微かなバンドは予想外であり、最小フラグメントは観察されない。沈殿消化産物の質量スペクトルは高分解能で同様のパターンを示す。表Vと比較すると、観察される質量は1本鎖DNAに一致する。酸性マトリックス環境(3-HPA, pKa3)と、イオン化により337nmで吸収する3-HPAとの相互作用を介して熱エネルギーを吸収させることを組み合わせると、正常MALDI条件下でdsDNAの短い配列は変性することが知られている(Tang, Kら, (1994) Rapid Commun. Mass Spectrom. 8:183-186)。

電気泳動で分解しなかった約25量体はMSにより3個の1本鎖フラグメントとして分解し、最大のもの(7427Da)は14.8kDaフラグメント(m=14850, z=2; m/z=7425)からの2電荷イオンに相当し、6715及び7153DaフラグメントはPCRアーチファクト又はプライマー不純物に起因すると思われる。増幅産物を消化前にQiagen精製キットで精製すると、全3個のピークは観察されない。表Vの8871Da29量体センス鎖3'末端フラグメントは観察されず、9186Daで検出される種はPCR増幅中に

Taq-ポリメラーゼにより付加される付加 (9187-8871=316、Aに一致) に一致する (Hu, Gr, (1983) DNA and Cell Biol 12:763-770)。<35塩基をもつ2本鎖 (11kDa) の個々の1本鎖は単一ピークとして分解されるが、48塩基1本鎖 (Mr (calc) 14845及び14858) は14850Daで未分解単一ピークとして観察される。これらを単一ピークに分離するには、この試験で利用した標準リフレクトロン飛行時間装置で通常得られるよりも約一桁大きい14850/13=1140の質量分解能 (m/Δm、質量と半高ピーク幅の比) が必要であるが、この質量範囲で3桁まで上の分解能を提供するフーリエ変換MS等の高性能装置ではこのような小さい質量差を分解できることが立証されている。91量体1本鎖 (Mr (calc) 27849及び28436) は<50の分解能しか必要としないが、この鎖も分解されない。質量が増すとピーク品質が著しく低下するのは、レーザー照射中及び照射後に内部エネルギーが過剰に吸収される結果、準安定断片化 (即ち脱プリン) が生じるためである。

CfoI及びRsaI同時消化。

図57b (挿入図) はe3/e3二重消化産物の12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動分離を示し、24、31、36、48及び53塩基対をもつdsDNAに一致するバンドが検出されるが、これよりも小さいフラグメントは検出されない。CfoI単独で消化するよりも多くのピークが生成される (表V) が、全フラグメントは<60塩基を含み、これは妥当な精度のMr値 (例えば0.1%) が所望される場合にMALDI-MSに遥かに適切な寸法範囲であるので、対応する質量スペクトルの解読は容易になる。この質量範囲のフラグメントでは、外部校正を使用した質量測定精度は-0.1% (即ち10kDaで<+10Da) である。10kDaを上回る全ピークに (図にアステリスクで示す) 顕著な脱プリンが観察されるが、17171Daの最大ピークでもその脱プリンピークから明白に分解されるので、正確なMrを測定することができる。消化産物のモル濃度は一定であるべきだが、これらのフラグメントとの間に±11塩基の差が観察されるのはエタノール/グリコーゲン沈殿段階での損失に起因すると思われる。

表 V

予想制限消化産物の質量及びコピー数

表 Va. CfoI消化^a

| (+) (-) | e2/e2 | e2/e2 | e2/e2 | e2/e2 | e2/e2 | e2/e2 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 5781, 5999 | - | - | 1 | - | 1 | 2 |
| 10752, 10921 | - | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 14845, 14858 | - | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 22102, 22440 | - | - | 1 | - | 1 | 2 |
| 25575, 25763 | 2 | 1 | 1 | - | - | - |
| 27849, 28436 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | - |

表 Vb. CfoI/RsaI消化^b

| (+) (-) | e2/e2 | e2/e3 | e2/e4 | e3/e3 | e3/e4 | e4/e4 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3428, 4025 | - | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 5283, 5880 | - | - | 1 | - | 1 | 2 |
| 5781, 5999 | - | - | 1 | - | 1 | 2 |
| 11279, 11627 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | - |
| 14845, 14858 | - | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 18269, 18848 | 2 | 2 | 1 | - | - | - |

・CfoI不変フラグメント質量: 1848、2177、2186、2435、4924、5004、5412、5750、8871、9628Da。

・CfoI/RsaI不変フラグメント質量: 1848、2177、2186、2436、4924、5004、5412、5750、6745、7510、8871、9628、16240、17175Da。

。生成されるフラグメントが小さいほうが高精度質量測定に良好であり、全遺伝子型で2量体ピークが高質量診断ピークにオーバーラップする可能

性はないので、CfoI (又はHhaI) とRsaIの同時消化によるMSの品質はCfoI (又はHhaI) 単独よりも優れている。RsaI/CfoI及びRsaI/HhaIによる消化は同一制限フラグメントを生じるが、前者は緩衝液要件が同一であるため同時消化として実施できるので、制限消化プロトコルによるその後の全遺伝子型別にはこの酵素混合物を使用した。

表 VI

| | ddT Mr (Calc) | ddT Mr (Exp) | ddC Mr (Calc) | ddC Mr (Exp) |
|-------|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|
| e2/e2 | *5918, *6768 | — | *6536, *7387 | — |
| e2/e3 | *5918, *6766, *7865 | 5918, 6769, 7867 | *6536, *6753, *7387 | 6542, 6752, 7393 |
| e2/e4 | *5918, *6768, *7865, *8970 | — | *5903, *6536, *6753, *7387 | — |
| e3/e3 | *5918, *7985 | 5918, 7986 | *6538, *6753 | 6542, 6756 |
| e3/e4 | *5918, *7985, *8970 | 5914, 7959, 8965 | *5903, *6538, *6753 | 5898, 6533, 6747 |
| e4/e4 | *7865, *8970 | 7866, 8969 | *5903, *6753 | 5900, 6752 |

・コドン112検出プライマー由来 (未伸長5629.7Da)。

・コドン158検出プライマー由来 (未伸長6480.3Da)。

ダッシュ (-) : この遺伝子型は100人の患者の分析プールから得られない。

図58a~cはCfoI消化後のアポEε3/ε3遺伝子型と種々の沈殿スキームを示し、同一増幅産物の等容量アリコートを実験に使用した。酢酸アンモニウム/エタノール/グリコーゲン溶液から1回沈殿させた試料 (図58a) は特に高質量で幅広いピークをもつ質量スペクトルを生じる。5.4、10.7及び14.9kDaの高強度ピークの質量は夫々予想値よりも

26Da (0.5%)、61Da (0.6%) 及び45Da (0.3%) 高く、これらの各々の分解能 (合計強度の2分の1におけるピーク幅とピークの測定質量の比) は-50であり、質量の増加と共に低下する。このような観測結果は高レベルの不揮発性カチオン付加に一致し、10.8kDaフラグメントでは、観察される質量シフトは付加: 非付加分子イオンの単位比を上回る。

再溶解し、二度目に沈殿した試料からのMSピークのほうが著しくシャープであり (図58b)、分解値は対応する図58aのピークのほぼ2倍である。質量精度値も著しく改善され、各々夫々の計算値の0.07%以内であり、3-HP

Aをマトリックスとして使用するDNA測定として測定した計器限界に近い。エタノールの代わりにイソプロピルアルコール (IPA) で一回 (図示せず) 及び2回 (図58C) 沈殿すると、分解能及び質量精度値は対応するエタノール沈殿と同等になるが、二量化レベルの増加が観察され、このようなダイマーが溶液中に存在する高質量「診断」モノマーにオーバーラップする場合には測定が混乱しかねない。グリコーゲンを核生成剤としてEtOH/酢酸アンモニウム沈殿すると、7量体以外のフラ

グメントをほぼ定量的に回収できるので、MS検出前に同時濃縮及び脱塩段階として利用できる。グリコーゲンの不在下で同一EtOH/酢酸アンモニウム溶液から沈殿すると、特に低質量で回収は著しく不十分である。

これらの結果が示すように、IPA及びEtOH/沈殿後に正確な M_r (exp) 値を得るためには、第2の沈殿により高い質量精度と分解能を維持することが必要である。

マトリックス: 消化産物の比もスペクトル品質に影響し、(1 μ Lに再溶解した) 1:1容量のマトリックス: 消化産物で観察される高質量フラグメント (図示せず) の著しい減少は、3~5倍容量のマトリックスを使用することにより軽減される。

酵素消化によるアポE遺伝子型別。コドン112及び158多型性は(RsaIでなく) CfoI認識配列に該当する。本実施例で試験した252bp増幅産物では、不変 (即ち全遺伝子型で切断される) 部位は塩基31、47、138、156、239及び246の後に切断を生じる。塩基66の後の切断部位はe4にしか存在せず、塩基204の後の切断部位はe3とe4に存在し、e2遺伝子型はこれらの部位のいずれでも切断されない。これらの制限パターンの相違は質量スペクトルの変

化として立証することができる。図59は100人の患者のプールから入手可能な数種のアポE遺伝子型の質量スペクトルを示す (Braun, Aら, (1992) Hum. Gent. 89:401-406)。予想される表Vの診断フラグ

参照すると、より迅速に同定することができる。図59aのスペクトルについて説明すると、11kDaに強いピーク対があるのでホモ接合e4の可能性はないが、他の5種の遺伝子型は区別できない。同様に、14.8kDaの未分解フラグメントが存在するのでホモ接合e2ではないが、4種の可能性 (e2/e3、e2/e4、e3/e3、e3/e4) がある。これらのうちでe2/e3とe2/e4のみが18kDaピークに一致し、5283、5879、5779及び5998Daのピークをもたないことから、図59aの試料はe2/e3であると判断される。同一手順を使用して図59b~dの遺伝子型を夫々e3/e3、e3/e4及びe4/e4と同定することができる。現在までこの方法による全対立遺伝子同定は慣用方法により得られる同定に一致しており、多くの場合には慣用方法よりも容易に解釈されている。フラグメント強度比を表Vのコピー数に一致させることにより帰属を更に確認することができる。例えば、図59aでは14.8kDaフラグメントは16~17kDaフラグメントよりも強度が低い、図59b~dでは逆である。後者3種の遺伝子型では14.8kDaが2コピー存在するが、前者はe2を含むヘテロ接合体であるため、

増幅産物の2分の1は14.8kDaシグナルに加えられないので、これは予想通りである。同様に、11kDaフラグメントの強度を9.6及び14.8kDaフラグメントの強度と比較すると、このフラグメントは図59a、dでは夫々2、2、1及び0コピーである。これらのデータは、MALDIがこれらの条件下で半定量的に実施できることを裏付けている。

プライマーオリゴ塩基伸長 (PROBE) によるアポE遺伝子型別。コドン112及び158多型性の同時検出手段としてPROBE反応を更に試験した。3'末端が可変部位のすぐ下流となるように検出プライマーを1本鎖PCR増幅誘型にアニールした。3種のdNTPと(dNTPとして存在しない) 1種のddXTPの存在下にこのプライマーをDNAポリメラーゼにより伸長すると、多型性塩基の種類に依存する長さや質量をもつ産物が生じる。特定塩基特異的チューブが99%ddXTP及び1%ddXTPを含む標準Sanger型シーケンシングとは異なり、PROBE混合物は他の3種のdNTPと共に特定ddXTP

特表2002-507883

メントに対応する質量に鋭点線をつけ、他の表示フラグメントは不変である。表Vに関して、所与の対立遺伝子に2コピーが存在する場合にしかフラグメントは「不変」とみなさず、この要件を満たすためには、このようなフラグメントはe2me3及びe4対立遺伝子の各々で生成されなければならないことに留意されたい。

図59aのスペクトルは3kDaを上回る全予想不変フラグメントと、3428及び4021 (いずれも弱い)、11276及び11627 (いずれも強い)、14845、18271並びに18865Daの診断ピークを含む。図59bのスペクトルは、18kDaのピーク対が検出されず、特に11~18kDaフラグメント間の相対ピーク強度が異なる点を除いてはほぼ同一である。図59cのスペクトルは更に18kDaフラグメントをもたない代わりに5~6kDa間に別の低強度ピークをもつ。9kDaを上回るフラグメントの強度比は11kDa

フラグメント対が比較的低い点を除いて図59bと同様である。図59dも5~6kDaにピーク群を含むが、11kDaフラグメントを含まない唯一のスペクトルであり、先の2つのスペクトルと同様に18kDaフラグメントをもたない。

各スペクトルの膨大な数のピークにも拘わらず、表Vbの診断ピークの数個のみの有無により各遺伝子型を同定することができる。使用するMALDI-TOF装置の分解能の制限により、5、2~6、0kDaの4個の診断フラグメントは数個の不変ピークにはばオーバーラップするので、e4対立遺伝子の特徴であるこれらのフラグメントの有無に基づく遺伝子型は最も区別しにくい。本発明では、5283Da診断フラグメントは5412Da不変フラグメントからの脱プリンピークにオーバーラップし、5781Da診断ピークは通常は5750Da不変フラグメントから完全に分解されないことが判明した。従って、5880及び5999Daフラグメントの有無によりe2/e4とe2/e3又はe3/e4とe3/e3対立遺伝子を区別する。これらの各々は図59c及び59dには存在するが、59a又は59bには存在しない。

図59の患者の各々の遺伝子型は図60のフローチャートで

P100%を含む。このように、PROBEではddXTPに相補的な第1の塩基に到達後に全検出プライマーの完全な停止がさせられる。

e2/e3遺伝子型では、PROBE反応 (ddTTP、dATP、dCTP、dGTPの混合物) によりコドン112プライマーは5919Da、コドン158プライマーは6769及び7967Daに M_r (exp) シフトし (表V1)、e2/e3遺伝子型はこの位置でヘテロ接合であるため、単一コドン158プライマーの結果として1対の伸長産物が生じる。ヘテロ接合体e3/e4からは3種の伸長産物 (コドン158から1種とコドン112から2種) も観察される (図61c及び表V1) が、図61b (e3/e3) 及び図59d (e4/e4) ホモ接合対立遺伝子からは2種の産物 (各プライマーから1種) しか観察されない。表V1を参照すると、利用可能な対立遺伝子の各々は理論質量の0.1%以内で全予想ddT反応産物質量を生じるので、各々はこのデータだけで明確に特徴付けられる。ddCTP (及びdATP、dTTP、dGTP) を用いて反応を繰り返すことにより、対立遺伝子種の別の構造も得られ、表V1にも要約するこれらの結果はddTの結果を明確に裏付ける。

方法の妥当性。図59 (制限消化) 及び61 (PROBE) を比較すると、PROBE法は制限消化分析よりもコドン112

及び158多型性の多重分析のために著しく容易に解釈可能なスペクトルを提供する。消化産物は質量スペクトル当たり25ピークまでを生じ、診断フラグメントが不変フラグメントとオーバーラップする場合もあるが、PROBE反応は検出プライマー当たり最大2個のピークしか生じない (即ち多型性)。後者のほうが自動化ピーク検出、スペクトル分析及対立遺伝子同定が遥かに容易であることは明白である。同一又は異なる増幅産物からの数個の多型性部位を単一チューブから測定する高度多量化PROBEのスペクトルも簡単に分析できると予想される。その融通性を強調すると、PROBEデータ分析はプライマー長を慎重に先験的に選択することにより更に単純にすることができ、プライマー長はプライマー又は産物の質量がオーバーラップしないようにデザインすることができる

。

従って、PROBEは予め十分に特性決定された多型性部位の大規模臨床試験に選択される方法であるが、本実施例に記載するような制限消化分析は新しい突然変異のスクリーニングに理想的に適している。本試験で論じる2種の多型性の各々の型はフラグメントパターンに影響を与えるので、多型性の型が使用する唯一の情報である場合には、MS検出は制限フラグメン

ト長多型性産物の慣用電気泳動分離よりも迅速な代用方法である。他の単一点突然変異は突然変異を含む2本鎖フラグメントの1本鎖の各々の質量を必然的に変化させるので、フラグメントM_r値の正確な測定は、酵素認識部位から完全に離れた部位に関する情報を与えることができる。252bp増幅産物が対立遺伝子変異体も含む場合には、例えば従来記載されているGly127Asp (Weisgraber, KH, (1984) J. Clin. Invest. 73:1024-1033)、Arg136Ser (Wardell, MR, (1987) J. Clin. Invest. 80:483-490)、Arg142Cys (Horie, Y, (1992) J. Biol. Chem. 267:1962-1968)、Arg145Cys (Rall SC Jr, (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:4696-4700)、Lys146Glu (Mann, WA, (1995) J. Clin. Invest. 96:1100-1107)、又はLys146Gln (Smit, M, (1990) J. Lipid Res. 31:45-53) 置換を生じる。G→A塩基置換はGly127Aspアミノ酸置換をコー

ドし、センス鎖の-16Daシフトとアンチセンス鎖の+15Da (C→T) シフトを生じるが、制限パターンには変化を生じない。このような小さい変化は電気泳動ではほとんど判別できないが、精密質量測定により置換を検出することができ、16240(センス)及び17175Daの不变55量体は夫々16224及び17190Daにシフトする。微量の未分解付加物及び/又は十分に定義されないピークは正確な質量測定能を制限するので、現行のMALDI-TOF装

) Science 266:2011-2015)。本実施例で使用するアッセイは、基質プライマー(TS)のテロメラーゼ特異的伸長と、反復構造に相補的な第2のプライマー(bioCX)を使用したPCR段階によるテロメラーゼ特異的伸長産物の後期増幅に基づく。ゲル電気泳動及び標識又は染色システムを使用してこれらのアッセイの特徴的ラダーフラグメントを常法により検出する。これらの方法をMALDI-TOFマスペクトロメトリーに置き換えると、より迅速で正確な自動検出が得られる。

材料と方法

細胞の調製

培養テロメラーゼ陽性細胞1×10⁶個をペレット化し、PBS(滅菌DEPC水中137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄・7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄)で1回洗浄した。調製した細胞は-75℃で保存することができる。組織試料は抽出前に当業者所周知の手順によりホモジナイズする必要がある。

テロメラーゼ抽出

ペレットをCHAPS溶解用緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1mMベンズアミジン, 5mM β-メルカプトエタノール, 0.5%CHAPS, 10%グリセロール)200μlに再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。試料を12,000gで30分間4℃で遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、使用時まで75℃で保存した。

TRAPアッセイ

最終容量50μl中、10×TRAP緩衝液(200mM Tris-HCl, pH8.3, 15mM MgCl₂, 630mM KCl, 0.05% Tween 20, 10mM EGTA)、50×dNTP混合物(dATP, dTTP, dGTP及びdCTP各2.5mM)、TSプライマー10pmol及びbioCXプライマー50pmolの混合物にテロメラーゼ抽出物2μlを加えた。混合物を30℃で10分間及び94℃で5分間インキュベートし、Taq P

置を使用してこのような小さい質量シフトを検出するために必要な質量精度を得ることは内部較正を用いても容易でない。高性能エレクトロスプレーイオン化フーリエ変換(ESI-FTMS)を使用すると、100量体まで(Little, DP, (1994) J. Am. Chem. Soc. 116:4893-4897)の合成オリゴヌクレオチド(Little, DP, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:2318-2322)で高いDa精度が達成されており、最近ではMALDI-FTMSを使用して25量体までで同様の結果が達成されている(Li, Y, (1996) Anal. Chem. 68:2090-2096)。

実施例13

テロメラーゼ活性に関連するDNAフラグメントのマスペクトロメトリー測定方法

序論

米国の全死因の4分の1は悪性腫瘍である(R. K. Jain, (1996) Science 271:1079-1080)。診断及び治療目的で確実且つ高感度の腫瘍細胞検出方法に高い関心が寄せられている。

悪性細胞は種々の性質により正常細胞から区別することができる。その1つとして、悪性細胞は不死化しており、無制御に細胞増殖することができる。正常2倍体哺乳動物細胞を培養すると、老化前に限定回数(通常50回)の集団増加分を経る。この増加分は各細胞分裂でテロメアと呼ばれる染色体末端の短縮に関係があると予想される。この短縮の理由は慣用半保存複製機構の性質による。DNAポリメラーゼは5'→3'方向にしか作用せず、RNAプライマーを必要とする。

不死化は活性テロメラーゼの発現に関係があると考えられる。このテロメラーゼは鎖型の反復伸長を触媒するリボヌクレオタンパク質である。この活性はテロメア反復増幅プロトコル

(TRAP)として知られる特殊なPCRシステムによりテロメラーゼを含む細胞の天然タンパク抽出物で検出することができる(N. W. Kimら(1994

olymrase 2単位を加え、30秒間94℃、30秒間50℃及び45秒間72℃を30サイクル繰り返してPCRを実施した。

TRAPアッセイ産物の精製

各TRAPアッセイ産物を精製するために、Streptavidin M-280 Dynabeads (10mg/ml) 50μlを1×BW緩衝液(5mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5mM EDTA, 1M NaCl)で2回洗浄した。2×BW緩衝液50μlをPCR混合物に加え、ビーズをこの混合物に再懸濁した。ビーズを静かに震盪しながら15分間周囲温度でインキュベートした。上清を取り出し、ビーズを1×BW緩衝液で2回洗浄した。ビーズに25%水酸化アンモニウム50μlを加え、60℃で10分間インキュベートした。上清を取り出し、操作を繰り返し、2つの上清をプールの、エタノール(100%)300μlを加えた。30分後にDNAを13,000rpmで12分間ペレット化し、ペレットを風乾し、超純粋600nlに再懸濁した。

TRAPアッセイ産物のMALDI-TOF MS

試料300nlを飽和マトリックス溶液(50%水性アセトニトリル中3-H PA:クエン酸アンモニウム=10:1モル比)500nlと混合し、周囲温度で乾燥し、マスペクトロメーター(Vision 2000, Finigan MAT)

に導入した。外部較正を使用してリフレクターモードで全スペクトルを測定した。

配列及び質量

bioCX:d(bio-CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TAA、配列番号45)、質量:7540Da。

TS:d(AAT CCG TGC AGC AGA GTT、配列番号46)、質量:5523Da。

テロメア反復構造:(TTAGGG)_n、1反復の質量:1909.2。

増幅産物:

テロメア反復3個分伸長したTS (第1回増幅産物) : 12452 Da (N_3)

。

テロメア反復4個分伸長したTS : 14361 Da (N_4)。

テロメア反復7個分伸長したTS : 20088 Da (N_7)。

結果

図62はTRAPアッセイMALDI-TOF質量スペクトルの一部を示す。プライマーTS及びbioCXは夫々5497及び7537 Da (計算値5523及び7540 Da) に帰属

される。アステリスクを付けたシグナルは化学DNA合成のn-1プライマー産物に相当する。第1のテロメラーゼ特異的TRAPアッセイ産物は12775 Daに帰属される。この産物は3個のテロメア反復を含む40量体に相当する。プライマー配列により、これは陽性TRAPアッセイの第1の予想増幅産物である。この産物はTaq DNAポリメラーゼのエキステンターゼ活性による付加的ヌクレオチドの分だけ伸長している (非伸長産物計算値: 12452 Da、A分伸長した産物: 12765 Da)。6389 Daのシグナルはこの産物の2電荷イオンに相当する (計算値: 6387 Da)。図63は図62に示す同一のスペクトルの高質量部分を示し、従って、12775 Daのシグナルは図62と同一である。7個のテロメア反復を含み、同様に付加ヌクレオチド分伸長した64量体に相当するTRAPアッセイ産物は20322 Da (計算値20395 Da) で検出される。1、2、3及び4で示したシグナルは基線分解することができない。この領域は、1は2量体n-1プライマーのシグナルを含み、2は4個のテロメア反復を含み、従って、46量体 (計算値: 14341 Da/エキステンダーゼ伸長産物14675 Da) に相当する第2のTR

APアッセイ増幅産物を含み、3は2量体プライマーイオンと更にその対応する全脱プリンシグナルを含む。第2の伸長産物と第5の伸長産物のシグナルにはギャップが観察される。このシグナルギャップはTRAPアッセイのオートラジオグラフ分析で場合により第3及び第4の伸長産物に観察されるバンド強度の低下

細胞又は組織処理

培養細胞をペレット化し (10分間、8000 rpm)、PBS (滅菌PEP C水中137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM KH_2PO_4) で2回洗浄した。溶液が粘性になるまでペレットを溶解/結用緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1%ドデシル硫酸Li, 5 mM DTT) 1 mlに再懸濁した。1 mlシリリングを使用してDNA剪断段階により粘度を下げた。溶解液は-75℃で保存してもよいし、そのまま更に処理してもよい。固体組織 (例えば患者試料) は溶解前にホモジナイズする必要がある。

磁性オリゴdT (25) ビーズの調製

細胞 1×10^6 個当たりビーズ100 μL を保存用緩衝液から分離し、溶解/結用緩衝液200 μL で2回洗浄した。

ポリA+RNAの単離

調製したビーズに細胞溶解液を加え、5分間周囲温度でインキュベートした。ビーズを2~5分間磁的に分離し、LDS (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.15 M

LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LDS) 0.5 mLで2回洗浄した。

固相第1鎖cDNA合成

ポリA+RNAを含むビーズを逆転写混合物 (50 mM Tris-HCl, pH8.3, 8 mM MgCl_2 , 30 mM KCl, 10 mM DTT, 1.7 mM dNTP, 3 U AMV逆転写酵素) 20 μL に再懸濁し、1時間45℃でインキュベートした (再懸濁段階は10分間)。ビーズを逆転写混合物から分離し、溶解用緩衝液 (2 mM EDTA, pH8.0) 50 μL に再懸濁し、95℃まで1分間加熱し、RNAを溶解した。cDNA第1鎖を含むビーズはその後の処理に備えてTB (0.089 M Tris-塩基, 0.089 M 硼酸, 0.2 mM EDTA, pH8.0)、TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) 又は70%エタノールに保存することができる

に対応する (N. W. Kimら (1994) Science 266:2013)。

2量体プライマー及び関連シグナルにより生じる上記問題は、MALDI-TOF MS分析前にプライマーを除去するための分子量カットオフ膜を使用する限外濾過段階により解決することができる。こうすると、第2の増幅産物の明確な帰属が可能になる。

実施例14

MALDI-TOFマスマススペクトロメトリーによる神経芽細胞腫特異的入れ子RT増幅産物の検出方法

序論

神経芽細胞腫は主に乳幼児腫瘍であり、症例の66%が5歳未満の幼時に発生している。最も一般的な症状は腫瘍痛、骨の痛み又は過剰カテコールアミン分泌に起因する症状である。稀

ではあるが、出生前に神経芽細胞腫が確認される場合もある (R. W. Jenningsら, (1993) J. Ped. Surgery 28:1168-1174)。神経芽細胞腫をもつ患者の約70%は診断時に転移症状をもつ。予後は診断時の年齢、臨床段階及び他のパラメーターに依存する。

診断目的では、例えば自己由来骨髄移植又は進行中の治療の制御下に腫瘍細胞を検出する確実で高感度の方法に高い関心が寄せられている。

カテコールアミン合成は神経芽細胞腫細胞の特徴的性質であり、骨髄細胞はこの活性を欠く (H. Naitoら, (1991) Eur. J. Cancer 27:762-765) ので、神経芽細胞腫細胞又は骨髄転移はカテコールアミンの生合成の第1段階を触媒するヒトチロシン3-ヒドロキシラーゼ (E. C. 1.14.16.2, hTH) により同定することができる。

hTHの発現は逆転写 (RT) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により検出することができ、増幅産物はMALDI-TOFマスマススペクトロメトリーにより分析することができる。

材料と方法

入れ子ポリメラーゼ連鎖反応

cDNA第1鎖を含むビーズ1×PCR緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH8.75, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Tri

ton X-100, 0.1 mgウシ血清アルブミン) で2回洗浄し、(各外部プライマー100 pmol, Pfu (exo-) DNAポリメラーゼ2.5 u、各dNTP 200 μM 及び最終容量50 μL のPCR緩衝液を含む) PCR混合物に再懸濁した。混合物を72℃で1分間インキュベートし、30サイクルPCR増幅した。入れ子反応のために、第1回PCR産物1 μL を鋳型として (外部プライマーを入れ子プライマーに変えた以外は上記と同様の) PCR混合物に加え、1分間94℃、1分間65℃及び1分間72℃の温度プログラムを20サイクル実施した。

入れ子増幅産物の精製

10,000 Daカットオフ限外濾過装置を使用してプライマーと低分子量反応副産物を除去する。限外濾過は7,500 gで25分間実施した。各PCR産物を精製するために、Streptavidin M-280 Dynabeads (10 mg/ml) 50 μL を1×BW緩衝液 (5 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) で2回洗浄し、限外濾過膜に加え、静かに震盪しながら15分間周囲温度でインキュベートした。上清を取り出し、ビーズを

1×BW緩衝液で2回洗浄した。ビーズに25%水酸化アンモニウム50 μL を加え、周囲温度で10分間インキュベートした。上清を取り出し、操作を繰り返し、2つの上清をプールし、エタノール (100%) 300 μL を加えた。30分後にDNAを13,000 rpmで12分間ペレット化し、ペレットを風乾し、超純粋600 nlに再懸濁した。

入れ子増幅産物のMALDI-TOF MS

試料300nLを飽和マトリックス溶液（水溶性アセトニトリル中3-H PA:クエン酸アンモニウム=10:1モル比）500nLと混合し、周囲温度で乾燥し、マスマスベクトロメーター（Vision 2000, Finigan MAT）に導入した。外部校正を使用してリフレクターモードで全スペクトルを測定した。

外部プライマー:

hTG1:d (TGT CAG AGC TGG ACA AGT GT、配列番号47)

hTH2:d (GAT ATT GTC TTC CCG GTA GC、配列番号48)

入れ子プライマー:

bio-hTH d (bio-CTC GGA CCA GGT GTA CC G CC、配列番号49)、質量:6485Da。

hTH6:d (CCT GTA CTG GAA GGC GAT CTC、配列番号50)、質量:6422.21Da。

ビオチン化1本鎖増幅産物の質量:19253.6Da。

非ビオチン化1本鎖増幅産物の質量:18758.2Da。

結果

ヒトチロシン3-ヒドロキシラーゼ (hTH) 特異的な入れ子増幅産物 (61量体) のMALDI-TOF質量スペクトルを図64に示す。18763Daのシグナルは増幅産物の非ビオチン化鎖に対応する (計算値:18758.2Da、質量誤差:0.02Da)。10,000Da未満及び35,000Daを上回るシグナルは夫々多電荷及び2量体増幅産物イオンに起因する。

産物は上述のように神経芽細胞腫細胞系 (L-A-N-1) の細胞1×10⁶個から逆転写反応で誘導した固相cDNAから得た。外部プライマー (hTH1及びhTH2) を使用してcDNA第1鎖に第1回PCRを実施し、このPCRのアリコ

olを加え、混合物を30秒間94℃に加熱した後、10秒間94℃及び45秒間50℃を30サイクル繰り返し、5分間95℃でインキュベーション後、上清をデカントし、10mg/mLグリコーゲン0.5μLを加えてエタノール沈殿により生成物を脱塩した。得られたペレットを70%エタノールで

洗浄し、風乾し、H₂O 1μLに懸濁した。この懸濁液300nLをステンレス鋼試料プローブ上でMALDIマトリックス (1:1H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、0.07Mクエン酸アンモニウム) と混合し、風乾した。Thermo Bioanalysis Vision 2000 MALDI-TOFをターゲット及び変換ダイノード夫々5及び20kVのリフレクトロンモードで運転して質量スペクトルを測定した。報告実測質量 (M_r (exp)) は外部校正を使用して測定した中性分子の質量である。

診断産物の直接測定

コドン634を含む44bp領域のPCR増幅条件は、Pfuポリメラーゼを使用し、順プライマーの3'末端にリボヌクレオチドを加えた以外は上記と同一とした (順、5'-GAT CCA CTG TGC GAC GAG C (配列番号54)-ribo;逆、5'-GCG GCT GCG ATC ACC GTG C (配列番号55))。産物固定化及び洗浄後、12.5%NH₄OH 80μLを加え、80℃で一晩加熱し、44量体 (センス鎖) からプライマーを開裂し、25量体を得た。高温のうちに上清をビベットで捨て、乾燥し、H₂O 50μL

に再懸濁し、沈殿させ、再懸濁し、上述のようにMALDI-TOFにより測定した。25量体合成類似体のMALDI-F TMSスペクトルを従来記載されているように測定し (Li, Yら, (1996) Anal. Chem. 68:2090-2096)、要約すると、DNA1~10pmolを直接挿入プローブ上でマトリックスと1:1で混合し、外部イオン源 (陽イオンモデル) に入れ、337nm波長レーザーパルスで照射してイオン化し、rf専用四重極ロッドにより6.5テスラ磁場に移し、衝突によりトラップした。15秒遅延後、広帯域c

ートを鋳型とし、入れ子プライマー (bio-hTH及びhTH6) を使用して第2回PCRを実施した。入れ子増幅産物を精製し、MALDI-TOF MS分析した。

図64のスペクトルは入れ子RT-PCR及びMALDI-TOF MS分析を使用して神経芽細胞腫細胞を検出できることを立証するものである。

実施例15

マスマスベクトロメトリーを使用するRET癌遺伝子コドン634突然変異の迅速検出

材料と方法

プローブ

3個の対立遺伝子の各々におけるコドン634の存在をRsaI酵素消化、1本鎖コンホメーション多型性又はSangerシーケンシングにより確認した。5'-ビオチン化順 (5'-ビオチン-CAT GAG GCA GAG CAT ACG CA-3'、配列番号51) 及び未修飾逆 (5'-GAC AGC AGC ACC GAG ACG AT-3'、配列番号52) プライマーをチューブ当たり各8pmol使用してTaq-Polymerase (Boehringer-Mann

nheim) でゲノムDNAからRET遺伝子のエキソン11を増幅し (40サイクル)、増幅産物をQiagen "QIAquick" キットで精製し、取り込まれていないプライマーを除去した。Dynalストレプトアビジンをコートした磁性ビーズ10μL (10mg/mL) に増幅産物15μLを固定化し、製造業者のプロトコルを使用して変性させ、アンチセンス鎖を含む上清を捨て、thermoSequenase (TS) DNA Polymerase (Amersham) とPharmacia dNTP/ddNTPを使用してPROBE反応を実施した。H₂O 13μL、TS緩衝液2μL、2mM ddATP (又はddTTP) 2μL及び0.5mM dGTP/dCTP/dTTP (又はdGTP/dCTP/dATP) 0.2μLに伸長プライマー (5'-CGG CTG CGA TCA CCG TGC GG-3'、配列番号53) 8pm

hirpパルスによりイオンを励起し、256Kデータ点を使用して検出した。5秒周期の時間ドメインシグナルが得られた。報告 (中性) 質量は電荷をもつプロトンの質量 (1.01Da) を差し引いた後の最高頻度同位体ピークの質量である。

結果

本実施例の第1のスキームは図65に模式的に示すPROBE反応を利用する。突然変異部位の下流の相補的鋳型上の領域に特異的に結合するように20量体プライマーをデザインし、ビオチンで標識してストレプトアビジンをコートした磁性ビー

ズに固定化した鋳型にアニーリングすると、3種のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) の混合物、ジ-dNTP (ddNTP) 及びDNAポリメラーゼがPROBEプライマーに結合する (図65)。プライマーはコドン634中の可変塩基の種に特異的な一連の塩基分だけ伸長し、任意の反応混合物 (例えばdA+dT+dC+dG) で3種の対立遺伝子に相当する3種の可能な伸長産物が得られる (図65)。

陰性対照 (図66) では、ddATP+dNTP (N=T, C, G) を用いてPROBE反応を行うと、プライマーのM_r (exp) は6135から6726Daにシフトする (Δm+591)。6432のピークが存在しないのでC→A突然変異の可能性はなく (図65)、観察される単一ピークの質量はC→A突然変異体で予想されるA₃TCT₂GからT-ddA伸長した質量 (M_r (calc) 6736, -0.15%誤差) よりもC-ddA伸長した質量 (M_r (calc) 6721, +0.07%誤差) に近い。ddA及びddT反応データをまとめると、陰性対照は予想通りコドン634でホモ接合正常であることが明らかである。

患者1のddA反応も野生型とC→T突然変異の予想値の間

に単一ピーク (M_r (exp) =6731) を生じる (図65b)。しかし、ddT反応はヘテロ接合野生型 (M_r (exp) 8249, +0.04%質量誤差

)/C→T突然変異体 (M_r (exp) 6421, +0.08%質量誤差) に一致する2個の明白に分解したピークを生じる。患者2では、図66cのd d A産物対はヘテロ接合C→A (M_r (exp) 6431, -0.06%質量誤差) /正常 (M_r (exp) 6719, -0.03%質量誤差) 対立遺伝子に相当する。d d T反応はこれを裏付け、未分解野生型及びC→A対立遺伝子に一致する単一ピークが8264 Daで測定される。図66a及び66bを比較すると二重反復実験の意義がわかり、患者1ではd d A反応からの6726のピークは1種にしか相当しないが、患者1からの同様のピークは実際には質量が15 Da異なる1対の未分解ピークである。

点突然変異検出の代替スキームは診断産物質量の直接測定による対立遺伝子の区別である。RET634部位を含む4量体をPCRにより生成し、その3'末端のリボヌクレオチドのNH₄OH開裂により19量体センスプライマーを除去した。

図67はRET634突然変異部位を含む短い増幅産物の合

成類似体の一連のMALDI-FTMSスペクトルを示す。図67a~c及び67d~fは夫々ホモ接合及びヘテロ接合遺伝子型である。野生型遺伝子型に最高頻度の同位体ピークを使用して内部校正を行い、この(外部)校正を5個の他のスペクトルに適用すると、各々20 ppmよりも良好な質量精度が得られた。対立遺伝子の質量のみによる区別は16.00 (図67d)、2501 (図67e)又は9.01 Da (図65f)の差のある成分のヘテロ接合混合物でも確実である。小さいDNA質量シフトの認識は突然変異の有無の診断の基礎とする場合には、高性能MSの価値は明白である。最近では遅延抽出(DE)技術の再導入により短いDNAでMALDI-TOFの性能が改善されており(Roskey, M. T.ら, (1996) Anal. Chem. 68:941-946)、混合塩基50量体で $>10^3$ の分解能(RP)が報告されており、可変位置にC又はT (Δm 15 Da)をもつ1対の31量体が基線付近で分解している。このように、DE-TOF-MSはヘテロ接合体の個々の成分の分離に必要なRPを提供することがわかっている。しかし、DEでもTOFによるDNA質量測定精度

慣用トリチル- α -n DNA合成を使用してプライマーに5'-ジメトキシトリチル基を付けた。

フィルターチップに入れたオリゴ精製カートリッジからのC18ビーズ(0.2 mg)をアセトニトリルで洗浄した後、DNA溶液(25 μ l中50 ng)でフラッシュした。次にこれをクエン酸アンモニウム緩衝液(70 mM, 250 μ l)中5%

アセトニトリルで洗浄した。DNAをC18から分離するために、ビーズを40%アセトニトリル水溶液(10 μ l)で洗浄し、Speed vacで約2 μ lまで濃縮した。次に試料をMALDIにかけた。

その結果、疎水性相互作用を解離するには約30%のレベルのアセトニトリル/水で十分であることが判明した。MALDIで使用したマトリックスは50%アセトニトリルを含むので、(MALDIプロセス中に除去したトリチル基を用いて)MALDI-TOF MSを使用してDNAを支持体から遊離させ、有効に検出することができる。

図69は疎水性トリチルリンカーによる核酸固定化の模式図である。

実施例18

ストレプトアビジン-イミノビオチンによる核酸の固体支持体固定化

実験手順

製造業者に推奨される条件に従って、3'-又は5'-アミノリンカーにより2-イミノビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(Sigma)をオリゴヌクレオチドに結合し

た。反応の完了をMALDI-TOF MS分析により確認し、産物を逆相HPLCにより精製した。

各反応毎にストレプトアビジンをコートした磁性ビーズ(Dynal製品Dyna beads M-280 Streptavidin) 0.1 mgを1 M NaClと50 mM炭酸アンモニウム(pH 9.5)の存在下に対応するオリゴ80 pmolと室温で1時間インキュベートした。オリゴヌクレオチドと結合し

は外部校正を使用すると一般に0.1% (8 kDaで8 Da) であ

り、診断を誤るに十分高い値である。空間電荷誘導周波数シフト(Marshall, A. G.ら(1991) Anal. Chem. 63:215A~229A)の可能性にも拘わらず、MALDI-FTMS質量誤差が0.005% (8 kDaで0.4 Da)以上になることは稀であり、内部校正が不要である。

本発明のDNA点突然変異法は塩基突然変異の分析のみならず、単一又は多重塩基挿入又は欠失の検出や、2、3又は3個のタンデム塩基反復の定量にも適用できる。PROBE反応は比較的低性能のESI又はMALDI装置により分析可能な産物を生じ、短い増幅産物質量の直接測定は更に直接的な突然変異検出手段であるため、FTMSで利用可能な高性能MSへの関心の高まりと共に益々普及されると思われる。

実施例16

酸レーベル共有二官能性トリチルリンカーによる核酸の固体支持体固定化

標準方法に従ってアミノ結合DNAを調製及び精製した。一部(10当量)をspeed vacで蒸発乾涸し、無水DMF/ピリジン(9:1; 0.1 ml)に懸濁した。これに塩化ク

ロロトリチル樹脂(1当量、1.05 μ mol/mg添加)を加え、混合物を24時間震盪した。樹脂試料を抽出し、80%AcOHを使用してこれを脱トリチル化し、260 nmの吸光度を測定することにより添加量を調べた。添加量は約150 pmol/mg樹脂であった。

80%酢酸中で開裂半減期は実質的に5分未満であることが判明したが、これに対してトリチルエーテルを利用したアプローチの半減期はバラ及びメタ置換二官能性ジメトキシトリチルリンカーで夫々105及び39分である。DNAをクロロトリチル樹脂から開裂するにはヒドロキシピコリン酸マトリックス単独で十分であることも先行結果から分かった。

実施例17

疎水性トリチルリンカーによる核酸の固体支持体固定化

たビーズを50 mM炭酸アンモニウム(pH 9.5)で2回洗浄した。次に、ビーズを3-HPAマトリックス2 μ l中で室温で2分間インキュベートした。上清の0.5 μ lアリコートはMALDI-TOFに加えた。ビオチン置換実験では、遊離ビオチン1.6 mol (結合したオリゴの80倍)を50 mMクエン酸アンモニウム1 μ lに溶かしてビーズに加えた。5分間室温でインキュベーション後、3-HPAマトリックス1 μ lを加え、上清0.5 μ lをMALDI-TOF MSに加えた。結合したイミノビオチンオリゴの回収を最大にするために、上記処理からのビーズをもう一度3-HPAマトリックス2 μ lと共にインキュベートし、上清0.5 μ lをMALDI-TOF MSに加えた。マトリックス単独及び遊離ビ

オチン処理により、図70及び71に示すようにストレプトアビジンビオチンからイミノビオチンオリゴが定量的に遊離した。

実施例19

ループプライマーオリゴ塩基慎重を使用する突然変異分析

材料と方法

ゲノムDNA。ゲノムDNAは健康個体と鎌状赤血球貧血患者から得た。野生型及び突然変異対立遺伝子は標準Sangerシーケンシングにより慣用方法で決定した。

PCR増幅。ストレプトアビジンをコートしたビーズで捕獲する後期精製段階を実施せずに反応産物を使用するように β -グロブリンの一部のPCR増幅を設定及び最適化した。順プライマーとしてloop-cod5 d (GAG TCA GGT GCG CCA TGC CTC AAA CAG ACA CCA TGG CGC、配列番号58)及びビオチン化逆プライマーとして β -11-bio d (TCT CTG TCT CCA CAT GCC CAG、配列番号59)を使用してLOOP-PROBE反応のターゲット増幅を実施した。loop-cod5プライマー中の下線を引いたヌクレオチドは不変CfoI制限部位をアンブリコンに導入するように突然

変異させており、イタリック体で示したヌクレオチドは増幅産物の一部に相補的である。総PCR容量は50 μ lとし、ゲノムDNA200ng、Taq-ポリメラーゼ(Boehringer-Mannheim, Cat#1596594)1U、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP(Boehringer-Mannheim, Cat#1277049)及び各プライマー10pmolを含むものとした。5分間94℃の後、30秒間94℃、30秒間56℃、30秒間72℃を40サイクルと、2分間72℃最終伸長のサイクリング条件を使用して β -グロビン遺伝子の特定フラグメントを増幅した。

ビオチン化鎖型の捕獲及び変性。ストレプトアビジンをコートした常磁性ビーズ(10mg/ml; Dynal, Dynabeads M-280ストレプトアビジンCat#112, 06)10 μ lを5 \times 結合溶液(5M NH₄Cl, 0.3M NH₄OH)で処理し、40 μ l PCR容量に加えた(増幅産物10 μ lは電気泳動を調べるためにとっておいた)。30分間37℃でインキュベーション後、上清を捨てた。捕獲した鎖型を100mM NaOH50 μ lで5分間周囲温度で変性させた後、50mM NH₄OH50 μ lで1回、10mM Tris

Cl(pH8.0)100 μ lで3回洗浄した。1本鎖DNAをPROBE反応の鎖型として使用した。

プライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)反応。酵素としてSequenase 2.0(USB Cat#E70775Z、緩衝液を含む)と、Boehringer-Mannheim製品dNTP及びddNTP(Cat#1277049及び1008382)を使用してPROBE反応を実施した。dNTP(dCTP, dGTP, dTTP)とddATPの比は1:1とし、合計使用濃度は各ヌクレオチド50 μ Mとした。1倍Sequenase-緩衝液5 μ lの添加後、ビーズを5分間65℃、10分間37℃でインキュベートした。この時間中に部分的に自己相補的なプライマー-ターゲット部位にアニールした。100mMジチオトレイトール(DTT)0.5 μ l、dNTP/ddNTP溶液3.5 μ l及びSequenase(0.8U)0.5 μ lの添加後に酵素反応が開

式的に示す。コドン6の分析では、ビオチン化逆プライマー β 11bioとCfoI制限部位を導入するように修飾したプライマーloop-cod5を使用してPCRにより β -グロビン遺伝子の一部を増幅した(図72a)。増幅産物は192bp長であった。PCR後に、上述のようにストレプトアビジンをコートした常磁性粒子に増幅産物を結合した。2本鎖増幅産物の変性によりアンチセンス鎖を分離した(図72b)。短時間の熱変性段階と37℃のインキュベーションにより相補的3'末端の分子内アニーリング

を実施した。アンチセンス鎖の3'末端はこうして部分的に2本鎖になった(図72c)。アンチセンス鎖の自己アニールした3'末端の下流のDNAを分析するために、ddATP、dCTP、dGTP、dTTPを使用してプライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)を実施した(図72d)。こうすると、分析個体の遺伝子型に特異的な長さの種々の産物が生成される。これらの診断産物の長さを決定する前に、伸長産物の5'を切断するCfoI制限エンドヌクレアーゼと共にDNAをインキュベートした。この段階でステムループは鎖型DNAから遊離するが、伸長産物は鎖型に付着し続ける。その後、伸長産物を加熱して鎖型鎖から変性させ、MALDI-TOFマスペクトロメトリーにより分析する。

MALDI-TOF分析は非校正装置で実施したので、実測値と予測値の質量差は理論計算よりも約0.6%高かった。しかし、得られた結果は反復実験内で確実かつ再現可能であった。制限消化後に分析した全上清でステムループを検出することができた。遺伝子型から独立してステムループは全分析で分子量約8150Da(予測値8111Da)であった。図73aに1例を示す。この図面で質量4076Daの第2のピークはス

テムループの2電荷イオンである。図73b~73dは夫々の挿入図に示すような異なる遺伝子型の分析を示す。HbAは野生型遺伝子型であり、HbC及びHbSは鎌状赤血球病を誘発する β -グロビン遺伝子のコドン6における2種の異なる突然変異である。野生型状態では、分子量4247Daの単一ピークと6696Daの別のピークが検出される(図73b)。後者はPCR反応で使われ

始し、37℃で10分間インキュベートした。その後、ビーズを1倍TE緩衝液(10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)で1回洗浄した。

CfoI制限消化。Boehringer-Mannheim

から購入した1倍緩衝液L中10U CfoIを使用して総容量5 μ l中で制限酵素消化を実施した。インキュベーション時間は37℃で20分間とした。

診断産物のマスペクトロメトリー分析用条件付け

制限消化後、上清をH₂O 45 μ l、3M酢酸NH₄(pH6.5)10 μ l、グリコーゲン(水中10mg/ml、Sigma, Cat#G1765)0.5 μ l及び無水エタノール110 μ lで1時間室温で沈殿させた。13,000gで10分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18Mohm/cm H₂O2 μ lに再懸濁した。ビーズを0.7Mクエン酸NH₄100 μ l、次いで0.05Mクエン酸NH₄100 μ lで洗浄した。ビーズを50mM NH₄OH 2 μ l中で80℃に2分間加熱することにより診断産物を得た。試料調製及びMALDI-TOFマスペクトロメトリー分析。

ビーズを試料ターゲット上で50mM NH₄OH中で加熱後、再懸濁したDNA/グリコーゲンペレット又は上清0.3 μ lとマトリックス溶液(1:1H₂O:CH₃CN中0.7M3-ヒドロキシピコリン酸、0.07M二塩基性クエン酸アン

モニウム)0.6 μ lを混合することにより試料調製を実施し、風乾した。未改造Perspective Voyager MALDI-TOFのソース領域に試料ターゲットを自動導入し、ターゲット及び変換ダイノード夫々5及び20kVの遅延抽出リニアモードで運転した。理論分子量(M_r(calc))は原子組成から計算し、報告実測(M_r(exp))値は1プロトン化形態の値である。

結果

鎌状赤血球貧血を誘発するヒト β -グロビン遺伝子のコドン6の最も一般的な突然変異の検出にLOOP-PROBEを適用した。方法の各段階を図72に模

なかつたビオチン化PCRプライマー(β -11-bio)に対応し、実験によっては除去されている。前者はHbAの診断産物に対応する。HbS形質をもつ2個の各DNA分子とヘテロ接合性鎌状赤血球病化合物(HbS/HbC)を分析しても明白に予想通りの結果が得られる(図73c及び73d)。

結論として、LOOP-PROBEは突然変異、特に主要疾患を誘発する突然変異又は一般的多型性の強力な検出手段である。この方法は特定の突然変異検出用試薬を使用する必要がないため、プロセスが簡単になり、自動化し易い。分析する特定伸長産物はプライマーから開裂されるので、慣用方法に比較して短い。更に、アニーリング効率は添加したプライマーのアニーリングよりも高いので、より多量の産物を生成できる。この

方法は多重化及び種々の検出スキーム(例えば塩基伸長、オリゴ塩基伸長及びシーケンシング)に適合可能である。例えば、ループプライマーの伸長を使用して高多型性領域内で短い診断シーケンシングラダーを生成し、例えばHLA型別又は耐性及び種型別(例えばMycobacterium tuberculosis)を実施することができる。

実施例20

CKR-5のT7- β -RNAポリメラーゼ依存性増幅及びMALDI-MSによる検出

材料と方法

ゲノムDNA。ヒトゲノムDNAは健康な個体から得た。

PCR増幅及び精製。センスプライマーd(ACC TAG CGT TCA GTT CGA CTG AGA TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAG CTC TCA TTT TCC ATA C(配列番号60))としてckrT7fを使用してCKR-5遺伝子の一部のPCR増幅を行った。下線配列はCKR-5に相同の配列に対応し、太字配列はT7- β -RNAポリメラーゼプロモーター配列に対応し、イタリック体の配列はランダムに選択した。アンチセンスブラ

イマー-d (AAC TAA GCC ATG ... C ACA ACA (配列番号61))としてckr5rを使用した。QIAquick精製キット (Qiagen, cat #28104) を使用して増幅産物の精製と取り込まれなかったヌクレオチドの除去を行った。最終PCR容量は50 μ lとし、ゲノムDNA 200ng、Taq-ポリメラーゼ (Boehringer-Mannheim, Cat #1596594) 1U、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP (Boehringer-Mannheim, Cat #1277049) 及び各プライマー10pmolとした。5分間94℃の後、45秒間94℃、45秒間52℃、5秒間72℃を40サイクルと、5分間72℃の最終伸長からなるサイクリング条件を使用してCKR-5遺伝子の特定フラグメントを増幅した。

T7-RNAポリメラーゼ条件。精製したDNAの3分の1 (約60ng) をT7-RNAポリメラーゼ反応で使用した。(Boehringer-Mannheim, Cat #881767)。反応は試薬に含まれる緩衝液を使用して製造業者の条件に従って37℃で2時間実施した。最終反応容量は20 μ lとし、RNアーゼ (33U/ μ l) 0.7 μ lを加えておい

た。伸長反応後、酵素を5分間65℃でインキュベートして不活化した。

DNA消化及び診断産物のマスマスベクトロメトリー分析用条件付け。

無RNアーゼDNアーゼI (Boehringer-Mannheim, cat #776758) を不活化T7混合物に加えて室温で20分間インキュベートすることにより鑄型DNAを消化した。グリコーゲン (水中10mg/ml, Sigma, Cat #G1765) 1 μ l、3M酢酸NH₄ (pH6.5) 1/10容量及び無水エタノール3容量を加え、室温で1時間インキュベートすることにより沈殿させた。13,000gで10分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18Mohm/cm H₂O 3 μ lに再懸濁した。1 μ lをアガロースゲルで分析した。

試料調製及びMALDI-TOFマスマスベクトロメトリー分析。

試料ターゲット上でマトリックス溶液 (1:1H₂O:CH₃CNで0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、0.07M二塩基性クエン酸アンモニウム) 0.6

できる。このピークは非常に広いので、分子量を正確に測定することはできなかった。このピークは残留DNA鑄型には対応しない。第1に鑄型DNAは消化され、第2に、DNA鎖は夫々質量23036.0及び23174Daをもつと思われるからである。

本実施例から明らかなように、T7 RNAポリメラーゼはターゲットDNAを有効に増幅することができる。生成したRNAはマスマスベクトロメトリーにより検出することができる。

RNAポリメラーゼにより特異的に取り込まれるが、それ以上伸長しない修飾 (例えば3'-デオキシ) リボヌクレオチドと組み合わせると、本方法は鑄型DNAの配列を決定するために適用することができる。

実施例21

RNAエンドヌクレアーゼ消化産物のMALDIマスマスベクトロメトリー材料

合成RNA (試料A: 5'-UCCGGUCUGAUGAGUCCGUGAGGAC-3' (配列番号62); 試料B: 5'-GUCACUACAGGUGAGCUCCA-3' (配列番号63); 試料C: 5'-CCAUGCGAGAGUAAGUAGUA-3' (配列番号64)) 試料はDNA技術(Aarhus, デンマーク)から得、変性ポリアクリルアミドゲル (Shaler, T. A. ら (1996) Anal. Chem. 63:5766-579) で精製した。RNアーゼT₁ (Eurogentec)、U₂ (Calbiochem)、A (Boehringer-Mannheim) 及びPhyM (Pharmacia) はそれ以上精製せずに使用した。ストレプトアビジン

をコートした磁性ビーズ (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) は0.1%BSA及び0.02%Na₂Na₃を含むリン酸緩衝塩類 (PBS) にビーズ6~7 \times 10⁶個/ml (10mg/ml) を溶かした懸濁液として使用した。3-ヒドロキシピコリン酸 (3-HPA) (Aldrich) は、他の文献 (Little, D. P. ら (1995) Proc. N

μ lを再懸濁DNA/グリコーゲンペレット0.3 μ lと混合することにより試料調製を

実施した。試料ターゲットを未改造Finnigan VISION2000 MALDI-TOFのソース領域に自動導入し、5kVのリフレクトロンモードで運転した。理論分子量は原子組成から計算し、報告実測値は1プロトン化形態の値である。

結果

ケモカインレセプターCKR-5はHIV-1における主要コレセプターとして同定されている (例えばHuman Genome SciencesのWO 96/39437; Cohen, J. らScience 275:1261参照)。HIV-1血清陰性集団の16%には32bp欠失を特徴とする突然変異対立遺伝子が認められるが、HIV-1血清陽性集団ではこの対立遺伝子の頻度は35%低い。この対立遺伝子のホモ接合体はHIV-1耐性であると予想される。T7-RNAポリメラーゼ依存性増幅を利用してケモカインレセプターCKR-5のこの特異領域を同定した (図74)。慣用PCRを使用してヒトゲノムDNAを増幅した。センスプライマーは、ポリメラーゼ結合を助長する24塩基のランダム配列とT7-RNAポリメラーゼプロモーター配列を含むように改変した (図75)。推定転写開始はプロモーター配列の5'の最初の

塩基である。ckr5rをアンチセンスプライマーとして使用した。PCR条件は上記に要約した通りである。野生型対立遺伝子に由来する増幅産物は75bp長である。Qiagen QIAquick精製キットを使用してプライマーとヌクレオチドを増幅産物から分離した。精製物の3分の1をT7-RNAポリメラーゼによるin vitro転写に用いた。鑄型DNAの干渉を避けるために、無RNアーゼDNアーゼIを加えて消化した。開裂したDNA上清中に残し、RNAを沈殿させた。再溶解したRNAの一部をアガロースゲルで分析し、残りの試料はMALDI-TOF分析に用いた。産物の予想計算質量は24560Daである。概算質量25378.5Daに対応する主要ピークを観察することが

at1. Acad. Sci. U. S. A. 92, 2318-2322) により詳細に説明されているように使用前に別の脱塩段階により精製した。

方法

in vitro転写反応。(制限酵素BamHIで直鎖化した) プラスミドpUTMS2をT7RNAポリメラーゼ (Promega) で転写することにより5'-ビオチン化49nt in vitro転写産物 (配列番号65): AGGCCUGCGGCAAGACGGAAGACCAUGGUCCUNAU CUGCCGCAGGAUCを生成した。転写反応には、1u/ μ l RNAガード (Rnaxインヒビター, Pharmacia)、0.5mM NTP、1.0mM 5'-ビオチン-ApGジヌクレオチド、40mM Tris-HC

l (pH8.0)、6mM MgCl₂、2mMスベルミジン及び10mM DTTを含む50 μ l容量中で鑄型DNA3 μ gとT7RNAポリメラーゼ50uを使用した。37℃で1時間インキュベーションを行った後、T7RNAポリメラーゼ50単位の別のアリコートを加え、インキュベーションを更に1時間続けた。混合物を2M酢酸NH₄に調整し、エタノール1容量とイソプロパノール1容量を加えてRNAを沈殿させた。沈殿したRNAを4℃で90分間20,000 \times gで遠心分離して棄め、ペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、8M尿素に再溶解した。他の文献 (Shaler, T. A. ら (1996) Anal. Chem. 68:576-579) に記載されているように変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により更に精製した。5'-ビオチン化転写産物と非ビオチン化転写産物の比は約3:1であった。

リボヌクレアーゼアッセイ。選択したRNアーゼで部分消化するために、表VIIに要約するような種々の酵素濃度及びアッセイ条件を使用した。各酵素の消滅は製造業者の指示に従って選択した。合成RNA試料とin vitro転写産物の濃度は5~10 \times 10⁻⁶Mに調整した。

表 VII
RNアーゼの消化及びアッセイ条件

| RNアーゼ | 起源 | 濃度 [RNアーゼ] [RNA] | 条件 | 消化時間 (最大分/分) | 参考文献 |
|-----------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|---|
| T ₁ | Aspergillus oryzae | 0.2 | 20 mM Tris-HCl, pH 8.7, 37°C | 5 分 | Donis-Keller, H. et al. (1977) Nuc. Acids Res. 4:7577- 2537 |
| U ₂ | Ustilago Sphaerogena | 0.01 | 20 mM DAC, pH 5.0, 37°C | 15 分 | Donis-Keller, H. et al. (1977) Nuc. Acids Res. 4:2527- 2537 |
| PhyM | Physarum polysphaerum | 20 | 20 mM DAC, pH 5.0, 50°C | 15 分 | Donis-Keller, H. et al. (1980) Nuc. Acids Res. 8:3133- 3142 |
| A | ウシ肝臓 | 4 × 10 ⁶ | 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 37°C | 30 分 | Breslow, R. and R. Xu. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1201-1207 |
| CL ₃ | ニワトリ肝臓 | 0.01 | 10 mM Tris-HCl, pH 6.5, 37°C | 30 分 | Boguski, et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:2160-2163 |
| クサチビン | Quercus sativa L. | 0.05 ng | 10 mM Tris-HCl, pH 6.5, 37°C | 30 分 | Rollo, M.A. et al. (1994) Planta 194:328-336 |

アッセイの0.6 μlのアリコートを3 HPA溶液1.5 μlと混合することにより選択時間で反応を停止した。次に、MALDI-MS分析に備えて溶剤を冷気流中で蒸発させた。

等容量(2.0 μl)の25%水酸化アンモニウムとRNA試料(5~10 ×

A. 92:2318-2322) 金属カチオンをNH₄⁺と交換した。分析物溶液の0.6 μlのアリコートを平坦不活性金属支持体上で3-HPA 1.5 μlと混合した。NH₄⁺負荷カチオン交換ポリマービーズの溶液0.7 μlを加え、試料溶液中と支持体表面上に残っているアルカリカチオンを除去した。溶剤蒸発中に、調製物の内部に蓄積したビーズは分析に使用されず、ピペットチップで容易に除去した。

装置。典型的なVision 2000 (ThermoBioanalysis, Hemel, Hempstead, 英国) リフレクトロン飛行時間マスペクトロメーターをマスペクトロメーターに使用した。イオンは周波数3倍ND: YAGレーザー(355 nm, 5 ns; Spektrum GmbH, Berlin, ドイツ)の照射により生成し、10 keVまで加速した。遅延イオン抽出を使用するとシグナル対ノイズ比及び/又はシグナル強度が実質的に増加するので、図面に示すスペクトルは遅延イオン抽出を使用して獲得した。システムの総飛行経路長は1.7 mであり、基本圧力は10⁻⁴ Paである。高質量イオンを有効に検出するために変換ダイノードを取り付けたディスクリットダイノード二次電子マルチプライヤー(R

2362, Hamamatsu Photonics) でイオンを検出した。変換ダイノードに加えるイオンの総衝撃エネルギーは検出する質量に応じて16~25 keVの範囲の値に調節した。SEMの前置増幅出力シグナルは400 MHzまでのサンプリング速度でLeCroy 9450 トランジェントリコーダー(LeCroy, Chestnut Ridge, NY, 米国)によりデジタル化した。保存とその後の評価のために、特注ソフトウェア(ULISSES)を搭載したパーソナルコンピュータにデータを移した。全スペクトルは陽イオンモードで測定した。図面に示すスペクトルは各々20~30の単照射スペクトルの平均である。

結果

RNアーゼの特異性。塩基特異的RNA断裂とMALDI-MSを併用するには、選択した酵素の活性及び特異性を維持するように最適化した反応条件と、M

10⁻⁶M)を60℃で混合することにより制限アルカリ加水分解を実施した。選択時間に1 μlのアリコートを分取し、冷気流中で乾燥した。これらの試料の場合には、まず冷気流中で消化産物を乾燥してからマトリックス溶液1.5 μlとNH₄⁺負荷カチオン交換ポリマービーズ0.7 μlを加えることが重要であることが分かった。

5'-ビオチン化フラグメントの分離。ストレプトアビジンをコートした磁性ビーズを使用し、部分RNアーゼ消化後にin vitro転写産物の5'-ビオチン化フラグメントを分離した。5'-ビオチン-pApG-ジヌクレオチドにより開始された転写反応中にこの試料中のビオチン部分が導入された。使用前に、ビーズを2×結合及び洗浄用(b & w)緩衝液(20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 8.2)で2回洗浄し、2×b & w緩衝液に10 mg/mlで再懸濁した。上記プロトコルを使用してRNA

in vitro転写産物約25 pmolをRNアーゼU2で消化した。10 mMトランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン-N, N, N', N'-四酢酸(CDTA)を含む95%ホルムアミド3 μlを90℃で5分間加えて消化を停止した後、氷冷した。次いで、消化産物6 μlをビーズ懸濁液6 μl及びb & w緩衝液3 μlと共に室温で15分間インキュベートすることによりビオチン化フラグメントの捕獲を行った。製造業者により明示されているようにビーズ1 mg当たりビオチン化オリゴヌクレオチド200 pmolのビーズ結合能であるので、ほぼ2倍のオリゴヌクレオチドを使用してビーズの完全な添加を確保した。上清を取り出し、ビーズをH₂O 6 μlで2回洗浄した。CDTAと95%ホルムアミドを90℃に5分間加熱した。溶剤とホルムアミドの蒸発後、フラグメント≤2.5 pmolをH₂O 2 μlに再懸濁し、上述のようにMALDI-MSにより分析した。

MALDI-MS用試料調製。3-ヒドロキシピコリン酸(3-HPA)を超純水に約300 mMの濃度に溶かした。従来詳細に記載されているように(Little, D. P.ら(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.

MALDIの境界条件を満たすことが必要である。不適合の主因は、従来記載されている反応に一般に使用されているリン酸Na、クエン酸Na又は酢酸NaやEDTA等のアルカリイオン緩衝液がMALDI試料調製を妨げ、マトリックス結晶化及び/又は分析物取り込みを損

なうと予想されるためである。これに対して、Tris-HCl又はアンモニウム塩緩衝液はMALDI適合性である(Shaler, T. A.ら(1996) Anal. Chem. 68:576-579)。更に、試料中のアルカリ塩は分析物の多重塩の不均一混合物を形成し、リン酸基数の増加と共に問題は増加する。このような混合物は質量分解能及び精度とシグナル対ノイズ比を低下させる(Little, D. P.ら(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:2318-2322; Nordhoff, E., Cramer, R. Karas, M., Hillenkamp, F., Kirpekar, F., Kristiansen, K.及びRoepstorff, P. (1993) Nucl. Acids Res., 21, 3347-3357)。従って、文献に記載されている条件を多少変更してRNアーゼ消化を行った。これらの条件は上記表VIIに要約した。RNアーゼT₁、A、CL₃及びクサチビンには、Tris-HCl(pH 6~7.5)を緩衝液として使用した。20 mM DACはRNアーゼU₂及びPhyMの最大活性に推奨されているpH 5を提供する。濃度10~20 mMのこれらの化合物はMALDI分

析をさほど妨げないことが判明した。これらの条件下で選択リボヌクレオチドの特異性を試験するために、異なるヌクレオチド配列をもつ3種の合成20~25量体RNA分子を消化した。

図77のMALDI-MSスペクトルはRNアーゼT₁、U₂、PhyM、Aによる部分消化とアルカリ加水分解後に得られた25 nt RNAの5種の異なる断片パターン(A~E)を示す。これらのスペクトルは、配列を最適にカバーするように実験により決定したインキュベーション時間後にアッセイから分取したアリコートから得た。得られた試料はマスペクトロメーター前に断片化しな

ったので、その時点で各RNアーゼにより生じた全フラグメントを含んでいる。実際に、開裂の均一性は特定ホスホジエステル結合に優先的な攻撃により変化し得る (Donis-Keller, H., Maxam, A. M., 及び Gilbert, W. (1977) *Nucleic Acids Res.*, 4, 1957-1978; Donis-Keller, H. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 3133-3142)。予想されるフラグメントの大部分は実際にスペクトルに観察される。使用されているような反応プロトコールでは、2'、3' -環状リン酸

基と仮定した場合にしか全フラグメントの正しい帰属は不可能であることに留意すべきである。このような環状リン酸は開裂反応の中間体であり、酵素を用いる別の独立した遅い反応段階で加水分解されることがよく知られている (Richards, F. M. と Wycoff, H. W. in *The Enzymes* Vol. 4, 第3版 (Boyer, P. D. 編) 746-806 (1971, Academic Press, New York); Heinemann, U. と W. Saenger (1985) *Pure Appl. Chem.* 57, 417-422; Ikehara, M. ら (1987) *Pure Appl. Chem.* 59-965-968; Vreslow, R. と Xu, R. (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90, 1201-1207)。少数の例では異なるフラグメントの質量が1ダルトン程度しか変わらない場合もある。これらの場合には、質量ピークをフラグメントに明確に帰属させることができない。そこで、これらの曖昧さを解決するために、更に2種の異なる20nt RNA試料の消化が行われた (Hahner, S., Kirpekar, F., Nordoff, E., Kristiansen, K.,

Roepstorff, P. 及び Hillenkamp, F. (1996) *Proceedings of the 44th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Portland, Oregon*)。試験した全試料で、選択したリボヌクレオチドは特定ヌクレオチドでの

Donis-Keller, H., Maxam, A. M. 及び Gilbert, A. (1977) *Nucleic Acids Res.*, 4, 2527-2537; Boguski, M. S., Hieter, P. A. 及び Levy, C. C. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2160-2163; Donis-Keller, H. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 3133-3142)。試料中の尿素濃度がこのように高いと、3-HPAをマトリックスとするUV-MALDI分析は不可能である。反応緩衝液中2Mまでの尿素濃度では、マトリックス結晶化に有意変化が観察されたが、試料のMALDI分析はまだ可能であった。2M尿素の存在下で消化したRNA20量体 (試料B) のスペクトルは表VIIに記載した条件下で得られるものとまだ似ていた。

フラグメントパターンの複雑さを少なくし、各ヌクレオ塩基のマッピングを容易にするためには、1種のヌクレオ塩基のみを認識するRNアーゼによる消化が望ましい。RNアーゼCL₃及びクサチピンはシチジン酸残基で開裂することが報告されている酵素である。非変性条件下でRNアーゼ20量体 (試料B) をCL₃及びクサチピンで制限消化すると、従来報告されている

データ (Boguski, M. S., Hieter, P. A. 及び Levy, C. C. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2160-2163; Rojo, M. A., Arias, F. J., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Munoz, R., Escarmins, C., Soriano, F., Llopez-Fando, Mendez, E., 及び Girbes, T. (1994) *Planta*, 194, 328-338)と同様に、確かにシチジン残基での開裂に対応するフラグメントが観察された (図78)。しかし、図78の分解パターンによると、全てのシチジン残基が認識される訳ではなく、特に隣接するC残基は認識されていない。RNアーゼCL₃も二次構造の影響を受け易いと報告されている (Boguski, M. S., Hieter, P. A., 及び Levy, C. C. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 2160-2163)が、本試験で使用した寸法のRNアーゼではこの

み開裂し、単一及び多重開裂からのフラグメントが得られると思われる。

図77中、元の5'末端を含むフラグメントを示すピークは矢印で示す。無印の全ピークは内部配列又は保存された3'末端をもつ配列に帰属させることができる。完全な配列を得るには、元のRNAの5'又は3'末端の一方のみをもつ可能な全フラグメントで十分である。実際に、全3種の合成RNA試料のインキュベーション後に得られるスペクトルは異なる全RNアーゼの5'イオンの元のもののほぼ完全な組みを含むので、5'末端フラグメントはこの目的に好適である (Hahner, S., Kirpekar, F., Nordoff, E., Kristiansen, K., Roepstorff 及び Hillenkamp, F. (1996) *Proceedings of the 44th ASMS Conference*

on Mass Spectrometry, Portland, Oregon)。内部フラグメントは多少少なく、元の3'末端を含むフラグメントはスペクトルで抑制されているように見える。文献の報告されている知見通り (Gupta, R. C. と Randerath, K. (1977) *Nucleic Acids Res.*, 4, 1957-1978)、RNアーゼT₁及びU₂によるRNA25量体の部分消化産物では (内部フラグメントであるか又は元の5'末端を含む場合であっても) 3'末端に近い開裂が部分的に抑制された。このような開裂からのフラグメントは質量スペクトル中に弱く十分に分解されないシグナルとして現れる。

もっと大きいRNA分子では、二次構造が酵素開裂の均一性に影響を与えることが知られている (Donis-Keller, H., Maxam, A. M. 及び Gilbert, A. (1977) *Nucleic Acids Res.* 8, 3133-3142)。これは主に反応条件を変えることにより解決することができる。5〜7M尿素を含むアッセイ溶液では、RNAは十分に変性されるが、T₂、U₂、A、C、I₃及びPhyM等のRNアーゼの活性は保持されることが知られている (Do

ような影響は少ない。従って、この場合に認識されない開裂部位はこの酵素が特異性を欠くためであると考えられる。これらのデータを裏付けるために、RNA20量体 (試料C) で更にRNアーゼCL₃消化を行った。この分析物の

配列の結果として、シチジン酸を含む全3個の結合は容易に加水分解されたが、ウリジル酸残基での開裂も検出された。温度増加 (90℃)、種々の酵素対基質比及び2M尿素の添加等、反応条件を変えても予想される特異的消化は生じなかった。この酵素はシーケンシングにそれ以上適用しなかった。*Cucumis sativus* L. の乾燥種子から単離した新規シチジン特異的リボヌクレアーゼであるクサチピンの採用はRNAシーケンシングに有望であると思われる (Rojo, M. A., Arias, F. J., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Munoz, R., Escarmis, C., Soriano, F., Llopez-Fando, J., Mendez, E. 及び Girbes, T. (1994) *Planta*, 194, 328-338)。図78に示すように、酵素の推奨濃度でシチジン残基の全てが加水分解された訳ではなく、ウリジル酸残基にも開裂が生じた。従って、RNアーゼCL₃及びクサチピンではシチジン残基のマッピングに所望される配列情報が得られないので、それ以上使用しなかった。他方、*Physarum polycephalum* RNアーゼ (ApN, NpNを開裂) 及び豚RNアーゼA (UpN,

CpNを開裂) 等の多重特異性をもつRNアーゼを使用すると、ピリミジン残基を区別することができる (図77参照)。単一特異的RNアーゼU₂により生成され、図77Cのスペクトルに現れている全5'末端フラグメントはRNアーゼPhyM消化産物のスペクトル (図77D) でも明白であった。6個のウリジル開裂部位のうちの5個をこの間接法によりこうして固有に同定することができた。次段階では、ウリジン開裂部位の情報を使用し、同様に元の5'末端を含むイオンのみを使用してRNアーゼAと共にインキュベーション後に記録したスペクトル (図77E) からウリジル酸残基の開裂部位を同定した。4個の予想開裂部位のうちの2個をこうして同定した。元の5'末端を含むフラグメントのみを配

列決定に使用する場合、これらのスペクトルから多少のアーチファクト認められる。最初から2個のヌクレオチドは低質量マトリックスバックグラウンドでシグナルが消えるので通常は分析されない。このため、対応するフラグメントはU及びC特異的開裂スペクトル中に存在しない。3'末端に近接する開裂部位をもつ大きいフラグメントは収率が低く(上記参照)、非消化転写産物の強力なシグナルが近くにあることが多いので、特にRNアーゼT₁及びU₂消

化産物では同定しにくいことが多い。従って、2,2及び2,3位の開裂はG特異的RNアーゼTのスペクトル(図77A)には現れず、U₂及びPhyM消化産物のスペクトル(図77C及びD)から開裂部位2,4を同定することはできない。同様に図77EのRNアーゼAスペクトルでも2個の開裂するシチジル酸部位1,6及び1,7は同定できない。これらの知見から明らかなように、5'末端フラグメントのみを決定しても必ずしも十分ではなく、完全な配列分析には内部フラグメントに含まれる情報が必要である。

最後に、制限アルカリ加水分解は、配列データを補うために使用可能なフラグメントの連続を提供する(図77B)。この場合も、加水分解は全ホスホジエステル結合に等しく行われるが、スペクトルは5'末端を含むフラグメントのイオンが優勢である。酵素消化の場合と同様に、正しい質量帰属には全フラグメントが2', 3'-環状リン酸をもつと仮定する必要がある。従って、ピークの分布は3'-エキソヌクレアーゼ消化後に得られるものに似ている(Pieles, U., Zurcher, W., Schar, M. 及び Moser, H. E., (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21, 3191

—3196; Nordhoff, E. (1993) *Book of Abstracts, 13th Internat. Mass Spectrom. Conf., Budapest* p. 218; Kirpekar, F., Nordhoff, E., Kristiansen, K., Roepstorff, P., Lezius, A., Hahner, S., Karas, M. 及び Hillenkamp, F. (1994) *Nucleic Acid Res.*, 22, 386

は2種のビオチン化種の予想シグナルを示し、MALDI法における結合分子の遊離がビーズの結合よりもむしろ問題であることを証明している。図79Aは標準調製後の同一試料のスペクトルを示し、基準として全4種の分析物のシグナルを示す。溶離後でマスマスペクトロメトリー分析前にホルムアミドを完全に除去することが重要であり、そうしないと、マトリックスの結晶化を損なうことが分かった。スペクトル79Bにおける質量分解能及びシグナル対ノイズ比は基準スペクトルと同等である。Dynalビーズと共にインキュベーション後に非ビオチン化分析物のシグナルは全く又は僅かしか検出されなかったため、これらの結果はストレプトアビジン-ビオチン相互作用の特異性を裏付けている。結合用緩衝液に洗剤Tween-20を加えると、非特異的結合の抑制が増すことが報告されている(Tong, X. と Smith, L. M. (1992) *Anal Chem.*, 64, 2672-2677)。この効果は本試験でも

確認することができたが、ピークの広幅化が洗剤の残留量によるスペクトルの品質を悪化させた。捕獲ビオチン化種の検出の前提条件として溶離段階が必要なのは、ストレプトアビジンの磁性ビーズ固定化による複合体の安定化効果のためであると考えられる。

この固相法をシーケンシングに実際に適用するには、ビオチン化種の結合及び溶離効率を最大にすることが最も重要である。従来検討されている種々の条件のうちでは、DNAシーケンシングの場合には緩衝液にイオン強度を提供することによりEDTA等の塩を加えると最良の結果が得られた(Tong, X. と Smith, L. M. (1992) *Anal Chem.*, 64, 2672-2677)。固相方法に及ぼすこのような効果を試験するために、5'-ビオチン化RNA in vitro転写産物(49nt)の結合及び溶離に関して数種の添加剤を試験した。結果を図80に示す。各シグナルの相対強度、シグナル対ノイズ比及び分解能から判断すると、10mM CDTAを含む95%ホルムアミド溶液(図80D)が結合/溶離に最も有効である。CDTAは2価カチオンのキレート剤として作用するので、RNAの固有二次及び三次構造の形成が

6-3870)。従って、原則としてアルカリ加水分解は単独で完全なシーケンシングに使用することができると考えられる。しかし、大きいフラグメントイオンで質量が数質量単位しか変わらないものはスペクトルで分解せず、ピークが部分的又は完全に分解するとしても、大きいイオンの質量は1Daよりも良好な必要精度で測定することができないので、これは非常に小さいオリゴヌクレオチドにしか適用できない。元の5'末端を含むフラグメントのみがマスマスペクトロメトリー前に分離されるならば、特に未知のRNA試料の消化産物からのスペクトルの解読は実質的に簡単になる。このアプローチの方法を次項に記載する。

5'-ビオチン化フラグメントの分離。ストレプトアビジン

をコートした磁性ビーズ(Dynal)が元の5'末端を含むフラグメントを消化産物から抽出できるかどうかを試験した。この固相アプローチにチェックすべき主要な特徴はビオチン化種の選択的固定化と効率的溶離である。先行実験で5'-ビオチン化DNA(19nt)とストレプトアビジンをインキュベートし、標準調製後にMALDI分析した。ストレプトアビジン-ビオチン相互作用の高親和性にも拘わらず、MALDIスペクトルに無傷の複合体は認められなかった。その代わりに、ストレプトアビジンとビオチン化DNAのモノマーサブユニットのシグナルが検出された。複合体が酸性マトリックス溶液(pKa3)中又はMALDI脱着プロセス中に解離するか否かは不明である。驚くべきことに、ストレプトアビジンを磁性ビーズ等の固体表面に固定化すると、同一結果は観察されない。2種の5'-ビオチン化DNA試料(19nt及び27nt)と2種の未標識DNA配列(12nt及び22nt)の混合物をビーズと共にインキュベートした。ビーズを抽出し、注意深く洗浄した後、3-HPA MALDIマトリックス中でインキュベートした。これらの試料から分析物シグナルを得ることはできなかった。ビオチン化種がビーズに結合しているか否か

を試験するために、抽出及び洗浄したビーズを95%ホルムアミドの存在下に90℃に加熱することにより溶離を行った。この操作はストレプトアビジンを変性させ、ストレプトアビジン/ビオチン複合体を破壊すると予想される。図79B

妨げられる。エレクトロスプレーマスマスペクトロメトリーによるRNA試料の分析では、このような条件下で感度とスペクトル分解能の改善が立証されている(Limbach, P. A., Crain, P. F. 及び McCloskey, J. A. (1995) *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 6, 27-39)。MALDI分析の改善はホルムアミドのみを含む溶液で得られるスペクトルと比較して実際にさほど顕著ではない(図81b)が、良好な品質のスペクトルの再現性はCDTA/ホルムアミド溶液のほうが実質的に改善された。従って、結合/溶離の改善に加え、この添加剤は分析物のマトリックス結晶取り込みも改善すると思われる。残念ながら、EDTA、CDTA又は25%水酸化アンモニウムを含むホルムアミド溶液の場合には、高質量側に顕著なシグナル広幅化が観察された。これは25%水酸化アンモニウムの場合にも最も顕著であり、この添加剤はEDTA及びCDTAを最適pHに調整するためにも使用したので、NH₃付加物イオン形成が目立ったのだと予想できる。

ストレプトアビジンをコートした磁性ビーズによる分離をRNAシーケンシングに適用できることを5'-ビオチン化RNA

A in vitro転写産物(49nt)のRNアーゼU₂消化について立証した(図81)。RNアーゼU₂と共にインキュベーション後に得られた完全なフラグメントパターンをスペクトル81Aに示す。5'末端フラグメントのみがビーズに捕獲されるので、ビオチン化フラグメントの分離はスペクトルの複雑さを少なくする(図81B)。スペクトル中のシグナルは広幅化しており、低質量範囲のシグナル数が増加し、ビーズのストリンジェント洗浄後も結合と溶離に使用した緩衝液と洗剤が多少残存していることを示している。従って、方法の一層の改善が必要である。磁性ビーズを適用する別の戦略として、その後の分析のために残存フラグメントを溶離することによりRNアーゼ消化前にターゲットRNAを固定化することも考えられる。この場合、その他の反応条件を同一にすると消化反応時間が延び、RNAの開裂が悪化した。

実験例2.2

タグ付きプライマーを使用する並行DNAシーケンシング突然変異分析及びマイ

本実験例はDNA分析で生成されたDNA産物の特異的捕獲

に関する。捕獲は相補的配列に結合する分析産物の5'末端の特定タグ(5~8ヌクレオチド長)を利用する。捕獲配列は固体支持体に結合した部分2本鎖オリゴヌクレオチドにより提供することができる。例えば慣用チューブ又はマイクロタイタープレート(MTP)を使用して種々のDNA分析(例えばシーケンシング、突然変異、診断、マイクロサテライト分析)を並行して実施することができる。タグオリゴヌクレオチド上の相補的固定配列を介して産物を特異的に捕獲し、分別する。捕獲オリゴヌクレオチドは化学的又は生物学的結合により固体支持体(例えばシリコンチップ)に結合することができる。試料の固定は、捕獲オリゴヌクレオチドの規定位置により提供される。精製、条件付け及びマスペクトロメトリーを固体支持体で実施する。この方法を使用して6塩基タグ配列をもつ特定プライマーを捕獲した。

材料と方法

ゲノムDNA

ゲノムDNAは健康な個体から得た。

PCR増幅

順プライマーとして $\beta 2d$ (CATTTGCTTCTGAC

ACAAC、配列番号66)と逆プライマーとして $\beta 11d$ (TCTCTGTCTCCACATGCCAG、配列番号67)を使用して β -グロビン遺伝子の一部のPCR増幅を行った。総PCR容量は50 μ lとし、ゲノムDNA 200ng、Taq-ポリメラーゼ(Boehringer-Mannheim, Cat#159594)1U、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP(Boehringer-Mannheim, Cat#1277049)及び各プライマー10pmolを含むものとした。5分間94℃の後、30秒間94℃、45秒間53℃、30秒間72℃を40サイクル繰り返し、2分間72℃の最終伸長を行うサイクリング条件を使用して β -グロビン遺伝子の特定フラグメント

アニールした(図82A)。各オリゴヌクレオチドの濃度はddH₂O中10pmol/ μ lとし、2分間80℃と5分間37℃でインキュベートした。この溶液を-20℃で保存し、アリコートを分取した。アニールした捕獲オリゴヌクレオチド10pmolを30分間37℃でインキュベートすることによりストレプトアビジンをコートした常磁性ビーズ10 μ l(10mg/ml; Dynal, Dynabeads M-280 streptavidin Cat#112, 06)に結合した。ビーズを捕獲し、PROBE又はシーケンシング反応産物を夫々捕獲オリゴヌクレオチドに加えた。夫々 β -TAG1及び β -TAG2の結合を容易にするために、反応体を5分間25℃と30分間16℃でインキュベートした。ビーズを

氷冷0.7Mクエン酸NH₄で2回洗浄し、非特異的な結合伸長産物とプライマーを除去した。DDH₂O 1 μ lを加えて結合産物を溶解し、2分間65℃でインキュベートし、氷冷した。試料0.3 μ lをマトリックス溶液(アセトニトリル/水(50/50, v/v)中、飽和3-ヒドロキシピコリン酸、10%モル比クエン酸アンモニウム)0.3 μ lと混合し、風乾した。試料ターゲットを未改造Perspective Voyager MALDI-TOFのソース領域に自動導入し、ターゲット及び変換ダイノード夫々5及び20kVの遅延抽出リアモードで運転した。理論平均分子量(M_r(calc))は原子組成から計算し、報告実測M_r(M_r(exp))値は1プロトン化形態の値である。

結果

短い相補的配列による伸長産物の混合物の特異的捕獲を利用してシーケンシング及びプライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)産物を単離した。この方法を使用して夫々ヒト β -グロビン遺伝子のコドン5及び6とコドン30並びにIVS-1供与部位における推定突然変異を検出した(図82A)。ゲノムDNAはプライマー $\beta 2$ 及び $\beta 11$ を使用して増幅した。増幅産

物を精製し、ヌクレオチドを分離した。精製産物の5分の1をプライマーオリゴ

を増幅した。QIAquick精製キット(Qiagen, Cat 28104)を使用して増幅産物の精製と取り込まれなかったヌクレオチドの除去を行った。精製産物の5分の1をプライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)又はシーケンシング反応に夫々使用した。

プライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)及びシーケンシング反応

夫々ヒト β -グロビン遺伝子のコドン5及び6とコドン30

並びにIVS-1供与部位における推定突然変異の検出を並行して実施した(図82A)。 β -TAG1(GTCGTCCCATGGTGACCTGACTC、配列番号68)をプライマーとして使用してコドン5及び6を分析し、 β -TAG2(CGCTGTGGTGAGGCCCTGGGCA)配列番号69)をコドン30及びIVS-1供与部位の分析に使用した。プライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)反応は以下の条件を使用してサイクリングにより実施した。最終反応容量は20 μ lとし、 β -TAG1プライマー(5pmol)、 β -TAG2プライマー(5pmol)、dCTP、dGTP、dTTP(終濃度各25 μ M)、ddATP(終濃度100 μ M)、dNTP及びddNTP(Boehringer-Mannheim製品、Cat#1277049及び1008382)、10 \times ThermoSequence緩衝液2 μ l及びThermoSequenase(Amersham, Cat#E79000Y)2.5Uとした。サイクリングプログラムは5分間94℃、30秒間53℃、30秒間72℃及び8分間72℃の最終伸長段階とした。シーケンシングは反応容量を25 μ lとし、ヌクレオチドの濃度をddNTP250 μ Mとした以外は同一条件

で実施した。

TAG配列を用いる捕獲及び試料調製

捕獲オリゴヌクレオチドcap-tag1 d(GACGACGACTGCTACCTGACTCCA、配列番号70)とcap-tag2 d(ACAGCGGACTGCTACCTGACTCCA、配列番号71)を夫々等モル量のuni-as d(TGGAGTCAGGTAGCAGTC、配列番号72)にア

塩基伸長による分析に使用した。1回の反応で両部位を分析するために、プライマー β -TAG1及び β -TAG2を夫々使用した。 β -TAG1はコドン5及び6の上流に結合し、 β -TAG2はコドン30とIVS-1供与部位の上流に結合する。これらのプライマーの伸長はddATPとdCTP、dGTP及びdTTPの存在下にサイクリングにより実施し、個体の表現型に応じて特異的産物を得た。次に反応産物を捕獲オリゴヌクレオチドと混合した。捕獲オリゴヌクレオチドはビオチン化捕獲プライマー夫々cap-tag1及びcap-tag2を含む。これらは夫々 β -TAG1及び β -TAG2の5'末端に相補的な6塩基を5'末端にもつ。従って、捕獲オリゴヌクレオチドはこれらのプライマーと伸長産物を特異的に捕獲する。ユニバーサルオリゴヌクレオチド(uni-as)を捕獲オリゴヌクレオチドにアニールすることにより、捕獲配列のみを1本鎖とする部分2本鎖分子に捕獲プライマーを交換する(図82)。ストレプトアビジンをコートした常磁性粒子にこの分子を結合し、PROBE又はシーケンシング反応産物を夫々加える。特異的にアニールしたオリゴヌクレ

オチドのみを結合するように混合物を洗浄した。捕獲したオリゴヌクレオチドを溶解し、マスペクトロメトリーにより分析する。

1個の固体のPROBE産物(図83)は分子量7282.8Daの小さいピークを示す。これは計算質量7287.8Daをもつ未伸長 β -TAG1に対応する。8498.6Daのピークは4塩基分伸長した産物に対応する。これは野生型状態に対応する。この産物の計算質量は8500.6Daである。ヘテロ接合状態を示す有意ピークは存在しない。更に、 β -TAG2は捕獲されずに β -TAG1のみが捕獲され、この方法の高特異性を示している。

cap-tag2に結合したものの分析(図84)は、分子量9331.5Daのただ1個の主要ピークを示す。これは8ヌクレオチドの伸長に対応する。これは予想産物の計算質量が9355Daであるホモ接合野生型状態を示す。有意量の未伸長プライマーは存在せず、 β -TAG2のみが捕獲されている。

このアプローチが特異的シーケンシング産物を捕獲するのにも利用できることを証明するために、同一の2種のプライマー夫々 β -TAG1及び β -TAG2

を使用した。プライマーを

混合し、1回のシーケンシング反応で使用した後、上記方法を適用することにより分別した。これらのプライマーでddATPとddCTPを用いる2種の異なるターミネーション反応を実施した(夫々図85及び86)。スペクトログラムに観察される全ピークは野生型状態の計算質量に対応する。

上述のように、異なる突然変異(例えば異なるPROBEプライマー)の並行分析が可能である。更に、本発明の方法は特異的シーケンシング産物を捕獲するのにも利用できる。捕獲は1個の反応チューブ/ウェルから異なるシーケンシングプライマーの分離、特異的多量増幅産物、PROBE産物の単離等に使用することができる。サイクルシーケンシング等の慣用方法と慣用容量を使用することができる。汎用チップデザインにより多種多様のアプリケーションを利用できる。更に、この方法は高スループットを得るために自動化することができる。

実施例23

マスマススペクトロメトリーによる欠失検出

種々のフォーマットを利用して遺伝子内の欠失をマスマススペクトロメーターにより検出することができる。例えば、上記実施例に記載したように2本鎖増幅産物の分子量を測定したり、2

本鎖産物の一方又は両方の鎖を単離して質量を測定することができる。

あるいは、本実施例に記載するように、特異的酵素反応を実施し、対応する産物の質量をマスマススペクトロメトリーにより測定することもできる。欠失寸法は数十塩基長までとすることができ、この場合も野生型と突然変異対立遺伝子の同時検出が可能である。特異的産物の同時検出により、個体が特異的対立遺伝子又は突然変異のホモ接合であるかヘテロ接合であるかを1回の反応で測定することが可能である。

材料と方法

ゲノムDNA

白血球ゲノムDNAは無関係の健康個体から得た。

9及び1008382)。d(CAG CTC TCA TTT TCC ATA C (配列番号73))をPROBEプライマーとして使用した(図87)。以下の溶液:H₂O 3.0μl、反応緩衝液1.0μl、PROBEプライマー1.0μl(10pmol)をビーズに加え、65℃で5分間、次いで37℃で10分間インキュベートした。次いでDTT 0.5μl、dNTP/ddNTP(各50μM)3.5μl及びSequenase 0.5μlを加え、37℃で10分間インキュベートした。

DNAのT4処理

平滑末端DNAを生成するために、増幅産物をT4 DNAポリメラーゼ(Boehringer-Mannheim

Cat#1004786)で処理した。反応は製造業者のプロトコールに従って20分間11℃で実施した。

伸長産物の直接寸法決定

増幅産物の寸法を決定するために、増幅産物の一方の鎖にMALDI-TOFを適用した。試料を上述のようにビーズに結合し、下記のように条件付け及び変性した。

DNA条件付け

PROBE反応後、上清を捨て、ビーズをまず700mMクエン酸NH₄ 5.0μl、次いで50mMクエン酸NH₄ 5.0μlで洗浄した。ビーズをH₂O 2μl中で80℃に2分間加熱することにより、生成した診断産物を鋳型用に取り出した。上清はMALDI-TOF分析に使用した。

試料調製及びMALDI-TOFマスマススペクトロメトリーによる分析。

マトリックス溶液(1:1 H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸、0.07M二塩基性クエン酸アンモニウム)0.6μlを試料ターゲット上で水中で診断PROBE産物0.3μlと混合することにより試料調製を実施し、風乾した。100個までの試料をプローブターゲットディスクに

スポットして未改造Perspective Voyager MALDI-T

PCR増幅

ターゲットDNAのPCR増幅は、ストレプトアビジンをコートしたビーズを捕獲する後期精製段階を実施せずに反応産物を使用できるように設定及び最適化した。ターゲット増幅及びPROBE反応用プライマーは、CKRΔ-F:d(CAG CTC TCA TTT TCC ATA C、配列番号73)及びCKRΔ-R bio:d(AGC CCC AAG AT

G ACT ATC、配列番号74)とした。CKR-5は2分間94℃、45秒間52℃、5秒間72℃及び5分間72℃最終伸長からなるプログラムにより増幅した。最終容量は50μlとし、ゲノムDNA200ng、Taq-ポリメラーゼ(Boehringer-Mannheim, Cat#1596594)1U、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP(Boehringer-Mannheim, Cat#1277049)、未修飾プライマー10pmol及び5'ビオチン化逆プライマー8pmolを含むものとした。

ビオチン化鋳型の捕獲及び変性

ストレプトアビジンをコートした常磁性ビーズ(10mg/ml; Dynal, Dynabeads M-280 streptavidin Cat#112.06)10μlを5×結合溶液(5M NH₄Cl, 0.3M NH₄OH)に加え、PCR反応液45μlに加えた(PCR反応液5μlは電気泳動用にとっておいた)。30分間37℃でインキュベーションにより結合後、上清を捨てた。捕獲した鋳型を100mM NaOH 50μlで5分間周囲温度で変性させ、50mM NH₄OH 50μlで1回、10mM Tris/Cl(pH

8.0)100μlで3回洗浄した。1本鎖DNAをPROBE反応の鋳型として使用した。

プライマーオリゴ塩基伸長(PROBE)反応

Sequenase 2.0(USB Cat#E70775Z、緩衝液を含む)を使用してPROBE反応を実施した。dATP/dGTPとddNTPはBoehringer-Mannheimから入手した(Cat#127704

OF設置のソース領域に導入し、ターゲット及び変換ダイノード夫々5及び30kVの遅延抽出リニアモードで運転した。分析物の理論平均分子量(M_r(calc))は原子組成から計算し、報告質量M_r(M_r(exp))値はPROBE反応の場合には未伸長プライマーによる内部較正を使用して決定した1プロトン化形態の値である。

慣用分析

標準プロトコールに従って天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動により慣用分析を実施した。診断産物をゲルに加える前にホルムアミドで変性させ、夫々臭化エチジウム又は銀で染色した。

結果

健康な個体からランダムに選択した10個のDNA試料のCKR-5状態を分析した。白血球DNAをPCR増幅し、増幅産物のアリコートでDNAの標準ポリアクリルアミドゲル電気泳動及び銀染色により分析した(図88)。4個の試料が2個のバンドを示し、CKR-5ヘテロ接合性を示すと予想され、他の6個の試料はホモ接合遺伝子に対応する1個のバンドを示

した(図88)。2個のバンドが観察された場合には、野生型遺伝子の75bpと欠失をもつ対立遺伝子の43bpの予想寸法に対応する(図87)。1個のバンドが観察された場合には、寸法は約75bpであり、ホモ接合野生型CKR-5対立遺伝子を示した。ヘテロ接合と予想されるものからのDNA試料1個とホモ接合個体からの試料1個をその後の全分析に使用した。増幅産物の分子量を決定するために、マトリックス助剤レーザーデソープション/イオン化と飛行時間分析の併用分析(MALDI-TOF)によりDNAを分析した。ストレプトアビジンをコートした常磁性粒子に結合した2本鎖DNAを変性させ、上清から遊離した鎖を分析した。図89Aはポリアクリルアミドゲル電気泳動(図88)からの結果によりヘテロ接合であると予想されたDNA試料のスペクトログラムを示す。野生型遺伝子のセンス鎖の計算質量は23086Daであり、欠失対立遺伝子をもつセンス鎖は13143Daである(図87及び表V1)。多数の熱安定ポリメラーゼは産物の3'末端に非特異的にアデノシンを付加するので、その

質量も計算した。これらの質量は23349 Da及び23456 Daである。観察されるピーク（図89A）の質量は23119 Daであり、アデノシン

が付加された野生型DNA鎖の計算質量（23349 Da）に対応する。約23036 Daの質量をもつピークは観察されなかったため、ポリメラーゼは定性的にアデノシンを付加したと思われる。相互に近接する2つのピークは13451及び13137 Daの質量をもつ。これは32 bpを欠失した対立遺伝子の計算質量に対応する。質量の大きいほうのピークはアデノシンが付加された産物に対応し、質量の小さいほうのピークは非特異的アデノシンが付加されていない産物に対応する。どちらのピークもほぼ同一の高さであり、産物の約2分1にアデノシンが付加されたと考えられる。質量11682 Daのピークは23319 Daに対応するDNAの2電荷分子である（ $2 \times 11682 \text{ Da} = 23364 \text{ Da}$ ）。質量6732及び6575 Daのピークは質量13451及び13137 Daのピークの2電荷分子であり、7794 Daのピークは23319 Daの3電荷分子に対応する。多電荷分子は計算により常法により同定される。ホモ接合体からの増幅DNAはスペクトログラフ（図89C）に質量23349、6の1個のピークと質量23039、9 Daの著しく小さいピークを示す。質量の大きいほうのピークはアデノシンが付加された野生型対立遺伝子からの

DNAに対応する（計算質量23349 Da）。質量の小さいほうのピークはアデノシンが付加されていない同一産物に対応する。質量11686、7804、6及び5852、5 Daの別の3個のピークは2、3及び4電荷分子に対応する。

非特異的に付加されたアデニンはDNA及びT4 DNAポリメラーゼの処理により増幅DNAから除去することができる。ヘテロ接合及びホモ接合体からのDNAをT4 DNAポリメラーゼ処理後に分析した。図89Bはヘテロ接合DNAからのスペクトログラフを示す。野生型鎖に対応するピークは質量23008 Daであり、付加されたアデニンが完全に除去されていることを示す。質量13140 Daの鎖も同様である。

| 寸法 | 計算質量 | 実測質量 |
|----------|-------|-------------------|
| 野生型A付加なし | 23036 | 23039/23009/23004 |
| 野生型A付加 | 23349 | 23319/23350 |
| 欠失A付加なし | 13143 | 13137/13139 |
| 欠失A付加 | 13456 | 13451 |
| PROBE | | |
| 野生型 | 6604 | 6604/6608 |
| 欠失 | 6275 | 6275 |

全質量はダルトンで表す。

実施例24

ペンタプレックスtcr-PROBE

要約

動脈硬化症の病因に関与すると思われる3種の異なるアポリポタンパク質遺伝子中の5個の多型性部位を使用してサモサイクリングプライマーオリゴ塩基伸長（tcr-PROBE）の

多重化を実施した。アポリポタンパク質AⅣ遺伝子（コドン347及び360）、アポリポタンパク質E遺伝子（コドン112及び158）及びアポリポタンパク質B遺伝子（コドン3500）を試験した。全質量スペクトルは5個の多型性部位に関して容易に解読できた。

材料と方法

PCR増幅

ヒト白血球ゲノムDNAをPCRに使用した。アポAⅣ、アポE及びアポB遺伝子の部分の各増幅に使用したプライマーは下記の通りである。

アポAⅣ：

A347F：5'-CGA GGA GCT CAA GGC CAG AAT

他の3個のピークは親ピークの多電荷分子である。ホモ接合DNAの質量スペクトログラフはアデニンが付加されていない野生型DNA鎖に対応する分子量23004 Daの1個のピークを示す。他の全ピークはこのDNAの多電荷分子に由来する。増幅産物は上述のようにその質量の直接測定により分析することもできるし、その後の反応で増幅産物から得られる産物の質量を測定して分析することもできる。この「プライマーオリゴ塩基伸長（PROBE）」反応では、停止ヌクレオチドが取り

込まれる前にプライマーが数塩基分だけ伸長し、プライマーは入れ子PCRの場合には内部プライマーであり、あるいはPCRプライマーの1個と同一である。伸長する長さに応じて遺伝子型を特定することができる。CKRΔ-FをPROBEプライマーとして使用し、dATP/dGTP及びddTTPをヌクレオチドとして使用した。プライマー伸長は野生型鎖型の場合にはAGTであり、欠失の場合にはATである（図87）。対応する質量は野生型では6604 Daであり、欠失では6275 Daである。PROBEを2種の標準DNAに適用した。スペクトログラフ（図90A）は野生型DNAに対応する質量6604 DaとCKRΔ-5欠失対立遺伝子に対応する質量6275 Daのピークを示す（表V11）。質量5673 DaのピークはCKRΔ-Fに対応する（計算質量5674 Da）。他の試料も同様に分析した（図90B）。質量6607 Daのピークは野生型対立遺伝子に対応し、質量5677 Daのピークは未伸長プライマーに対応するので、これは明白にホモ接合DNAと同定される。その他のピークは観察されなかった。

本実施例から明らかなように、マスマススペクトロメトリーによ

り欠失分析を実施することができる。本実施例に示すように、欠失は1本鎖増幅産物の直接欠失により分析することもできるし、特異的に生成した診断産物により分析することもできる（PROBE）。更に、後記実施例26に示すように、2本鎖DNA増幅産物も分析できる。

-3'（配列番号75）

A360R-2-bio：*5'-CAG GGG CAG CTC AGC TCT C-3'（配列番号76）

アポE：

アポE-F：5'-GGC ACG GCT GTC CAA GGA-3'（配列番号77）

アポE-R bio：*5'-AGG CCG CGC TC

G GCG CCC TC-3'（配列番号78）

アポB：

アポB-F2 bio：*5'-CTT ACT TGA ATT CCA AGA GC-3'（配列番号79）

アポB-R：5'-GGG CTG ACT TGC ATG GAC CGG A-3'（配列番号80）

*ピオチン化。

Taq-ポリメラーゼと10×緩衝液はBoehringer-Mannheim（ドイツ）から購入し、dTNPはPharmacia（Freiburg、ドイツ）から購入した。総PCR反応容量は50 µlとし、各プライマー10 pmol、10% DMSO（ジメチルスルホキシド、Sigma）（アポB遺伝子のPCRにはDMSOは使用しない）、鎖型として使用したゲノムDNA~200 ng及び最終濃度200 µMのdNTPを含むものとした。Taqポリメラーゼ1Uを加える前に溶液を80℃まで加熱した。PCR条件は5分間95℃の後、30秒間94℃、30秒間62℃、30秒間72℃を2サイクル、30秒間94℃、30秒間58℃、30秒間72℃を2サイクル、30秒間94℃、30秒間56℃、30秒間72℃を

35サイクル繰り返し、72℃で2分間の最終伸長時間とした。取り込まれなかったプライマーとヌクレオチドを除去するために、増幅産物を“QIAquick”（Qiagen、ドイツ）キットで精製し、精製産物をTE緩衝液（10m

M Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 50 μ Lで溶離した。

増幅産物のビーズ結合

Dynalのプロトコルに従って各種増幅産物10 μ LをDyna Beads (Dynal, M-280 Streptavidin) 5 μ Lに結合し、変性させた。ペンタプレックスPCR反応のために、(ビーズに結合した) 3種の異なる増幅産物をプルした。

PCR

PCR反応には次のプライマーを使用した。

(アポA) P347: 5'-AGC CAG GAC AAG -3' (配列番号81)

(アポA) P360: 5'-ACA GCA GGA ACA GCA-3' (配列番号82)

(アポE) P112: 5'-GCG GAC ATG GAG

GAC GTG-3' (配列番号83)

(アポE) P158: 5'-GAT GCC GAT GAC CTG CAG AAG-3' (配列番号84)

(アポB) P3500: 5'-GTG CCC TGC AGC TTC AC T GAA GAC-3' (配列番号85)

tcr-PROBEは上記各プライマー10 pmol、Thermosequase (Amersham) 2.5U、Thermosequase緩衝液2.5 μ L、並びに夫々dTTP 50 μ M (終濃度) 及びddA/C/G/T P 200 μ Mを含む総容量25 μ L中で実施した。混合物を入れたチューブをサーモサイクラーに入れ、変性(94℃)のサイクリング条件にかけた。上清をビーズから注意深く取り出し、エタノール沈殿により「脱塩」し、Na⁺やK⁺等の不揮発性カチオンをNH₄⁺に交換してイオン化プロセス中に蒸発させ、3M酢酸アンモニウム(pH6.5) 5 μ L、グリコーゲン(10mg/mL, Sigma) 0.5 μ L、H₂O 25 μ L及び無水エタノール110 μ LをPROBE上清25 μ Lに加え、1時間4℃でインキュベートした。13,000gで1

5分間遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18Mohm/

cmHz 0.1 μ Lに再懸濁した。再懸濁したDNAの0.35 μ Lアリコートにステンレス鋼試料ターゲットディスク上でマトリックス溶液(1:1 H₂O:C H₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸(3-HPA)、0.07Mクエン酸アンモニウム) 0.35 μ Lと混合し、風乾後、Thermo Bioanalysis Version 2000 MALDI-TOFを使用し、ターゲット及び変換ダイノード夫々5及び20 kVのリフレクトロンモードで運転してスペクトルを獲得した。フラグメントの理論平均分子量(M_r(calc))は原子組成から計算した。合成(ATCG)_n、オリゴヌクレオチド(3.6~18 kDa)から生成した外部校正を使用した。1~37500 Daからの陽イオンスペクトルを集めた。

結果

表VIIIは可能な全伸長産物のプライマー自体の質量を含む計算分子量を示す。図91は3種の異なる鎖型と5種の異なるPROBEプライマーを1つの反応で同時に使用したtcr-PROBEの各MALDI-TOF MSスペクトルを示す。実測質量と計算質量(表VIII参照)を比較すると、個々のDNA試料中の種々の多型性部位を迅速に遺伝子分析できる。

図91に示す試料はアポリボタンバク質AIV遺伝子の夫々347及び360位のトレオニンとグルタミンに関してホモ接合であり、アポリボタンバク質E遺伝子にホモ接合のe3対立遺伝子をもち、更にアポリボタンバク質B遺伝子ではコドン3500でアルギニンに関してホモ接合である。

表 VIII

| アポリボタンバク質 | 配列番号 | 質量 | 対立遺伝子 |
|---------------------------------------|------|---------|--------------|
| アポリボタンバク質 A IV | | | |
| 5'-AGCCAGGACAAG-3' (347) | 86 | 3688.40 | 未伸長 プライマー |
| 5'-AGCCAGGACAAGTC-3' | 87 | 4266.80 | 347Ser |
| 5'-AGCCAGGACAAGA-3' | 88 | 3985.60 | 347Thr |
| 5'-ACAGCACCAACAGCA-3' (360) | 89 | 4604.00 | 未伸長 プライマー |
| 5'-ACAGCAGGAACAGCATC-3' | 90 | 5181.40 | 360His |
| 5'-ACAGCAGGAACAGCAG-3' (112) | 91 | 4917.20 | 360Gln |
| アポリボタンバク質 E | | | |
| 5'-GCGGACATGGAGGACGTG-3' (112) | 92 | 5629.60 | 未伸長 プライマー |
| 5'-GCGGACATGGAGGACGTGCC-3' | 93 | 6247.00 | 112Cys |
| 5'-GCGGACATGGAGGACGTGC-3' | 94 | 5902.80 | 112Arg |
| 5'-GATGCCGATGACCTGCAGAAAG-3' (158) | 95 | 6480.20 | 未伸長 プライマー |
| 5'-GATGCCGATGACCTGCAGAAAGC-3' | 96 | 6753.40 | 158Arg |
| 5'-GATGCCGATGACCTGCAGAAAGTG-3' | 97 | 7097.60 | 158Cys |
| アポリボタンバク質 B-100 | | | |
| 5'-GTGCCCTGCAGCTTCACTGAAGAC-3' (3500) | 98 | 7313.80 | 未伸長 プライマー |
| 5'-GTGCCCTGCAGCTTCACTGAAGACTG-3' | 99 | 7931.20 | 3500Gln |
| 5'-GTGCCCTGCAGCTTCACTGAAGACC-3' | 100 | 7587.00 | 3500Arg |

実施例 25

MALDI-TOFマスマスペクトロメトリーによるp53遺伝子のエクソン5~8のシーケンシング

材料と方法

ゲノムDNA 200 ng, Taq DNAポリメラーゼ1単位, MgCl₂

1.5 mM, dNTP 0.2 mM, 順プライマー10 pmol及びビオチン化逆プライマー6又は8を含む総容量50 μ Lを96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに加え、PCR反応を35サイクル実施した。確立化学(N. D. Sinha, J. Biernat, H. Kier, Tetrahed. Lett. 24:5843-5846 (1983))に従って調製したPCRプライマーの

配列は、エクソン5: d (ビオチン-TATCTGTTCACTTGTGCCC、配列番号101) 及びd (ビオチン-CAGAGGCCTGGGGACCCCTG、配列番号102); エクソン6: D (ACGACAGGGCTGGTTGCG、配列番号103) 及びd (ビオチン-ACTGACAACCACCCCTTAC、配列番号104); エクソン7: d (CTGCTTGCCACAGGTC TC、配列番号105) 及びd (ビオチン-CACAGCA

GGCCAGTGTGC、配列番号106); エクソン8: d (GGACCTG ATTTCTTACTG、配列番号107) 及びd (ビオチン-TGAATC TGAGGCATAACTG、配列番号108) である。

96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに未精製増幅産物に加え、5×結合溶液(5M NH₄OH) 10 μ L中の磁性ストレプトアビジンビーズ(Dynal) 0.1 mgに加え、37℃で30分間インキュベートした。

次にビーズを0.1M NaOHで室温で5分間処理した後、室温で5分間0.05M NH₄OHで1回、次いで50mM Tris-HClで1回洗浄した。

マイクロタイタープレートの各ウェルでジデオキシターミネーション反応を4回ずつ実施した。1個のマイクロタイタープレートで合計84回の反応(21プライマー×4回反応/プライマー)を実施することができる。固定化1本鎖鎖型を含む各ウェルに、1×反応緩衝液、シーケンシングプライマー10 pmol、dNTP 250 mM、ddNTPの1種25 mM及びThermosequase (Amersham) 1~2単位を含む総容量10 μ Lの反応混合物を加えた。シーケン

シング反応は80℃1分間、50℃1分間、0.1℃/秒の勾配で50℃→72℃及び72℃5分間の非サイクリング条件を使用してサーマルサイクラーで実施した。次にビーズを0.7Mクエン酸アンモニウム、次いで0.05Mクエン酸アンモニウムで洗浄した。次にビーズを50 mM NH₄OH 2 μ L中で2分間80℃まで加熱することによりシーケンシング産物を除去した。上清をMALDI-TOF MS分析に使用した。

マトリックスはKierら (Kier, H. Nature Biotechnol. 14:1123-1128 (1996)) に記載されているように調製した。その後、この飽和マトリックス溶液を使用前に純水で1.52倍に希釈した。希釈マトリックス溶液0.3μlを試料ターゲットに加え、結晶化させた後、分析物水溶液0.3μlを加えた。Per-septive Voyager DEマスマスペクトロメーターを実験に使用し、試料を一般にマニュアルモードで分析した。ターゲット及び中間プレートを各レーザー照射後200ナノ秒間+18.2kVに維持し、その後、ターゲット電圧を+20kVまで上げた。飛行チューブ内のイオンガイドワイヤーは-2Vに維持した。一般に、各試料に250回レーザー照射した。初期スペクトル

は500MHzデジタル化速度で獲得し、最終スペクトルは455点平均により平滑化した (Savitsky & Golay, (1964) Analytical Chemistry, 36:1627)。マスマスペクトロメーターのデフォルト校正を使用して各ピークを同定し、配列を帰属させた。2個のシーケンシングピークの理論質量値を使用して各スペクトルを再校正した (D. P. Little, T. J. Cornish, M. J. O'Donnell, A. Braun, R. J. Cotter, H. Kier, Anal. Chem., 寄稿中)。

結果

p53遺伝子の変異は多数のヒト癌の発生で危険段階であるとみなされている (Greenblattら (1994) Cancer Res. 54, 4855-4878; C. C. Harris, (1996) J. Cancer, 73, 261-269; 及びD. Sidransky & M. Hollstein, (1996) Annu. Res. Med., 47, 285-301)。突然変異はクローム産生能の分子インジケーターの役割をもち、一次腫瘍に既に突然変異が検出されている患者では再発の初期マーカーの役割をもつと考えられる (Hainaut

ら, (1997) Nucleic Acid Res., 25, 151-157

、ビーズをアンモニウムイオン緩衝液で洗浄し、他の

全カチオンを交換した。その後、水酸化アンモニウム溶液中又は単に水中で加熱することによりシーケンシングラダーをビーズから除去した。

先に加えたマトリックスを含む1個のMS試料ホルダーに84個のシーケンシング反応産物各1μl以下のアリコートを加えた。図94は1個のプライマーから生成したシーケンシングデータの1例を示し、4個のスペクトルを重ねたものである。

全シーケンシングピークは次のシーケンシングプライマー部位を介して解読するために必要な質量範囲で良好に分解した。2電荷ピークも観察され、1電荷イオンと質量を相関することにより容易に同定することができた。酵素伸長の初期停止により生じた偽停止ピークをプライマー部位の近くに検出することができる。質量分解能が十分高いので、隣接ピークの質量差を計算し、4個のスペクトルを比較することにより真のシーケンシングピークから偽停止ピークを容易に区別できる。更に、突然変異プライマーは下流プライマー結合部位の領域に検出可能なデータを生じ、偽停止領域をカバーしている。

至適化増幅、シーケンシング及び条件付け手順を使用し、p53遺伝子のエクソン5〜8を配列決定することができた。全

質量範囲にわたって約300〜800の質量分解能で全エクソンから正しい野生型配列データが得られた。総質量精度は0.05%又はそれよりも良好であった。MS試料ホルダーに添加された各シーケンシングフラグメントの平均量は50fmol以下と推定される。

本実施例から明らかなように、MALDI-TOF MSによりヒト遺伝子のエクソンを配列決定することができる。ゲルに基づく自動蛍光DNAシーケンシングと比較すると、リーディング長が短い。マイクロチップ技術を組み込むと、並行処理が可能である。マイクロタイタープレートで生成したシーケンシング産物を直接マイクロチップに移し、MALDI-TOFMS分析用発射パッドとして利用することができる。ロボット駆動シリアル及びパラレルナノリットル分配

)。癌の予後は存在するp53突然変異の種類によって異なると思われる (H. S. Gohら, (1995) Cancer Res. 55, 5217-5221)。p53遺伝子の発見以来、6000種を超える突然変異が検出されている。エクソン5〜8には突然変異の大半が集まっているので、シーケンシングターゲットとして選択した (Hainautら (1997) Nucleic Acid Res., 25, 151-7)。

図96は材料と方法の項に詳細に記載したように実施したシングルチューブターゲット増幅及びシーケンシング法を模式的に示す。イントロン領域にフランキングプライマーを使用し、下流プライマーはビオチン化し、p53遺伝子のエクソン5〜8の各々をPCR増幅した。同一サイクリングプロファイルを使用するように種々のエクソンの増幅を至適化し、それ以上増幅せずに産物を使用した。PCR反応は96穴マイクロタイタープレートで実施し、1個のウェルで生成した産物を1回のシーケンシング反応の鋳型として使用した。ストレプトアビジンをコートした磁性ビーズを同一マイクロタイタープレートに加え、

増幅産物を固定化した。その後、ビーズをNaOHで処理し、シーケンシング鋳型として固定化1本鎖DNAを生成した。残留塩基はシーケンシング酵素の活性を減じるのでビーズをTris緩衝液で十分に洗浄した。

合計21個のプライマーを選択してプライマーウォーキングによりp53遺伝子のエクソン5〜8をシーケンシングした。既知突然変異が存在しない部位に全プライマーの3'末端を配置した。ターミネーション反応を4回別々に実施し、同一PCRマイクロタイタープレートで合計84回のシーケンシング反応を実施した。ストレプトアビジンをコートしたビーズは高温の反復使用に耐えられないので、シーケンシングには非サイクリング条件を採用した。シーケンシング反応は末端に突然変異もつフラグメントが70ヌクレオチド未満となるようにデザインし、MALDI-TOF MSにより容易に測定可能でありながら次のプライマー結合部位をシーケンシングするのに十分長い寸法範囲となるようにした。Thermasequaseは所望質量範囲で高収率のシーケンシング産物を再現可能に生成することができたのでこれを選択酵素とした。シーケンシング反応後

ツールを使用し、平坦又は幾何 (例えばウェルを備える) 表面をもつ1" 平方チップ上に迅速マスマスペクトロメトリ分析用100〜1000素子DNAアレーが製造されている。

図94は試料をピンツールによりマイクロタイタープレートから移したチップで得られたMSスペクトルを示す。各停止産物の推定添加量は5fmol以下であり、放射性標識又は蛍光

検出による慣用Sangerシーケンシングで使用されている量 (0.5〜1fmol/フラグメント) の範囲内である。MALDI試料の堆積量が少なく、小型化 (試薬成分数の低減)、再現性の増加及びシグナル獲得の自動化といった利点がある。

実施例26

MALDI-TOF MSによる合成及び生物生成2本鎖DNAの直接検出手順

一般に、溶液中で2本鎖(ds)であるDNA分子をマトリックス介助レーザーデソープション/イオン化 (Karasら, (1989) Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 92, 231) 飛行時間マスマスペクトロメトリ (MALDI-TOF MS) にかけると、2個の1本鎖成分を表す分子イオンが得られ (Tangら (1994) Rapid Commun. Mass Spectrom. 8:183; Tangら (1995) Nucleic Acids Res. 23:3126; Bennerら (1995) Rapid Commun. Mass Spectrom. 9:537; Liuら (1995) Anal. Chem. 67:

3482; Siegertら (1996) Anal. Biochem. 243:55; 及びDoktyczら (1995) Anal. Biochem. 230:205)、これはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅から生物学的に生成したDNAに関する数件の報告に記載されている (Tangら (1994) Rapid Commun. Mass Spectrom. 8:183; Liuら (19

95) Anal. Chem. 67:3482. Tegertら(1996) Anal. Biochem. 243:55;及びDoktyczら(1995) Anal. Biochem. 230:205)。2本鎖が安定化されるのは、脱離/イオン化/ファンデルワールス引力と「スタッキング」安定化力を上回るに十分なエネルギーの加速中にマトリックス環境中のpHが低下するためであるか、あるいはデュプレクスにより吸収されるためであるかは不明である(Cantor & Shimmel, Biophysical Chemistry Part I: The conformation of Biomolecules, W. H. Freeman, New York, (1980), 176)。分析物が高濃度で存在する場合には、タンパク質の場合と同様に非特

異的気相DNAマルチマーが形成されることは知られている(Karasら(1989) Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 92:231)が、LecchiとPannelli(Lecchiら(1995) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6:972)は特異的ワトソンクリック(WC)塩基対合が気相に維持されることを立証する有力な証拠を報告している。同氏らは、6-アザ-2-チオチミンをマトリックスとして使用した場合にこれらの特異的二量体を検出したが、3-ヒドロキシピコリン酸(3-HPA)又は2, 4, 6-ヒドロキシアセトフェノンマトリックスを使用した場合には検出できなかった。後述するように、低いイオン加速電圧を使用し、低温でMALDI分析用試料を調製することにより、dsDNAの日常検出が可能である。

材料と方法

合成DNA. Perspective Expedite DNA合成器を使用してオリゴヌクレオチドを合成し(Sinhaら(1984) Nucleic Acids Res., 12, 4539)、社内で逆相HPLC精製した。配列は、50

量体(15337Da): 5'-TTG CGT ACA CAC TGG C

imから購入した。増幅産物20μlを水15μlと緩衝液L 4μlで希釈し、制限酵素10単位を添加

後、試料を60分間37℃でインキュベートした。消化産物を沈殿させるために、3M酢酸アンモニウム(pH6.5)5μl、グリコーゲン5μl(Braunら(1997) Clin. Chem. 43:1151)(10mg/ml, Sigma)及び無水エタノール110μlを分析物溶液50μlに加え、1時間室温で保存した。10分間13,000×gで遠心分離後、ペレットを70%エタノールで洗浄し、18Mohm/cm H₂O 1μlに再懸濁した。

試料調製及びMALDI-TOF MSによる分析。再懸濁したDNA0.35μlをマトリックス溶液(1:1H₂O:CH₃CN中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸(3-HPA)、0.07Mクエン酸アンモニウム)(Wuら(1993) Rapid Commun. Mass Spectrom. 7:142)0.35~1.3μlとステンレス鋼試料ターゲットディスク上で混合し、風乾後、Thermo Bioanalysis Vision 2000 MALDI-TOF装置を使用し、ターゲット及び変換ダイノード5及び20kVの陽イオンリフレクトロンモードで運転してスペクトルを獲得した。フラグメントの理論平均分子量(M_r(calc))は原子

組成から計算し、粗データ値からプロトン質量(1.08Da)を差し引いて中性基準で実測分子量(M_r(exp))を報告した。8個のピーク(2000~18000Da)から生成した外部較正を全スペクトルに使用した。

結果と考察

図96Aは合成50量体と(非相補的)27量体_{nc}(各10μM、本試験で使用する最高濃度)の混合物のMALDI-TOF質量スペクトルであり、レーザー出力はイオン化用閾値照射を僅かに上回るように調整した。8.30及び15.34kDaのピークは夫々27量体及び50量体1本鎖に由来する1電荷イオンに相当する。-16.6及び-30.7kDaの十分に分解していない低強度のシグナルは夫々27量体及び50量体のホモダイマーに相当し、23.6k

特表2002-507883

CG TCG TTT TAC AAC GTC GTG ACT GGG A
AA ACC CT-3' (配列番号109);27量体_c(相補、8343Da):5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG TGT AC
G CAA-3' (配列番号110);27量体_{nc}(非相補、8293Da):5'-TAC TGG AAG GCG ATC TCA GCA ATC AG
C-3 (配列番号111)であった。

18Mohm/cm H₂Oを使用してストック溶液100μMを20、10、5及び2.5μMまで希釈した。50量体と27量体_c又は27量体_{nc}の等モル溶液各2μlを混合し、室温で10分間アニールさせた。これらの混合物0.5μlを試料ターゲット上でマトリックス(50%アセトニトリル中0.7M 3-HPA、0.07Mクエン酸アンモニウム)1μlと直接混合し、風乾した。

生物DNA. 白血球からのヒトゲノムDNAの酵素消化を行った。アポリボタンパク質E遺伝子のエキソン4の一部を増幅するためのPCRプライマー(順、5'-GGC ACG G

CT GTC CAA GGA G-3' (配列番号112);逆、5'-AG G CCG CGC TCG GCG CCC TC-3' (配列番号113))を公衆配列(Dasら(1985) J. Biol. Chem., 260 6240)から作製した。Taqポリメラーゼと10×緩衝液はBoehringer-Mannheim(ドイツ)から購入し、dNTPはPharmacia(Freiburg,ドイツ)から購入した。総反応容量は50μlとし、各プライマー20pmol及び10%DMSO(ジメチルスルホキシド、Sigma)と鋳型として使用したゲノムDNA約200ngを含むものとした。ポリメラーゼ1Uを添加する前に溶液を80℃まで加熱した。PCR条件は2分間94℃の後、30秒間94℃、45秒間63℃、30秒間72℃を40サイクルと、2分間72℃最終伸長時間とした。増幅産物の最終収率を測定するために定量的データは集めなかったが、-2pmolを酵素消化に利用可能であったと推定される。

CfoI及びRsaIと反応緩衝液LはBoehringer-Mannhe

Daのシグナルは27量体鎖と50量体鎖を1本ずつ含むヘテロダイマーに一致する。このように、2種の非相補的オリゴヌクレオチドからの可能な全組み合わせ(27+27;27+50;50+50)に相当する低強度ダイマーイオンが観察された。脱プリンピークが優勢になる点まで照射を増加しても、スペクトルのこれらのダイマーピークの強度は僅かに高くなっただけであった。ハ

イブリダイゼーションは室温で非常に低い濃度、即ち非特異的ハイブリダイゼーションが生じるような条件で実施したことに留意されたい。

図96は同一50量体と(相補的)27量体_cの混合物のMALDI-TOFスペクトルを示し、各オリゴヌクレオチドの終濃度は同じく10μMとした。図96Aと同一のレーザー出力を使用した処、この場合も夫々1本鎖27量体及び50量体に一致する8.34及び15.34kDaに強いシグナルが観察された。ホモダイマーピーク(27+27;50+50)はノイズとしてかろうじて現れただけであったが、1電荷(23.68kDa)及び2電荷(11.84kDa)ヘテロダイマー(27+50)ピークは優勢であった。23.68kDaダイマーピークは全照射位置から検出できたが、モノマーピークに対するその強度はスポット毎に少しずつ異なっていた。5、2.5及び1.25μMの各オリゴヌクレオチド濃度で実験を繰り返すと、27及び50量体1本鎖ピークよりも少量の27/50量体ワトソンクリックダイマーピークが得られた。最低濃度では、ダイマーは「結晶依存性」であり、即ち照射すると、結晶によっては有意な27/50量体ダイマーシグナルを

生じたが、再現可能に殆ど又は全く生じない結晶もあった。これは、dsDNAのマトリックス結晶取り込み又はイオン化/脱離プロセスによるこの相互作用の維持効果が結晶の微細性質に依存すること、及び/又は試料全体を通してデュプレクスの急激な濃度勾配が存在することを示している。

このように、図96のスペクトルは、この質量範囲で高いオリゴヌクレオチド濃度で温和なレーザー条件を使用して特異的WC塩基対合dsDNAを観察できることを強く裏付けるものであり、3-HPAマトリックスを使用した最初の報

告である。本試験をアポリボタンパク質E遺伝子のエクソン4の領域の酵素消化 (RsaI/CfoI) により得られるdsDNAの複合混合物に応用した (Dasら (1985) J. Biol. Chem., 260:6240)。予想フラグメント質量を表IXに示す。

表IX

アポE遺伝子エクソン4^aからのCfoI/RsaIの消化産物

| 塩基 ^b | | ssDNA | (Da) | dsDNA (Da) |
|-----------------|-----|-------|-------|------------|
| (+) | (-) | (+) | (-) | |
| 11 | 13 | 3428 | 4026 | 7453 |
| 16 | | 5004 | 4924 | 9928 |
| 18 | | 5412 | 5750 | 11162 |
| 17 | 19 | 5283 | 5880 | 11163 |
| 19 | | 5999 | 5781 | 11780 |
| 24 | 22 | 7510 | 6745 | 14225 |
| 31 | 29 | 9628 | 9185 | 18813 |
| 36 | 38 | 11279 | 11627 | 22906 |
| 48 | | 14845 | 14858 | 29703 |
| 55 | 53 | 17175 | 16240 | 33415 |

^a e3対立遺伝子は17/19又は19/19対をもたず、e4対立遺伝子は36/38対をもたない。

^b (+) センセンス鎖、(-) アンチセンス鎖。

消化段階後、試料を精製し、エタノール沈殿により濃縮し、H₂O 1μLに再懸濁した後、試料ターゲット上で室温でマトリックスと混合した。質量3.4~17.2kDaの約20個のピークが産物のMALDIスペクトル (図97A) で分解され、これらは全て2本鎖の変性1本鎖成分に一致する (表IX)。

同様の生物産物を数カ月にわたって多数回このように分析した処、ごく僅かしかdsDNAを含まないスペクトルが得られ、従来の報告 (Tangら (1994

である。15.24及び17.18kDaフラグメントのホモダイマー化は夫々32.49及び34.35kDaピークを生じ、実測値33.35kDaに対するこれらの不正確な帰属の対応する質量誤差は夫々-2.6%及び+3.0%である。このピークが2個の最高質量1本鎖フラグメントのヘテロダイマーに由来するならば著しく良好な対合が得られ、質量の和 (16.24+17.18=33.42kDa) は実測ダイマー質量33.35kDaと0.2%の差であり、これは外部校正を使用して大きいDNAフラグメントをMALDI-TOF分析するのに許容可能な質量誤差である。同様に、29.66kDaフラグメントは48量体のヘテロダイマーの予想値29.70kDaより僅かに0.13%低い測定値であり、他の可能なホモダイマー又はヘテロダイマーの和のうちのこの質量の妥当範囲内のもはなかった。夫々36/38量体及び31/29量体ヘテロダイマーに相当する22.89及び18.83kDaフラグメントについても同じことが言え、14.86kDaのシグナルは1電荷1本鎖と2電荷2本鎖の48量体に一致する。>15kDaの図97Bの質量がこの消化産物から予想されるdsDNAの質量に一致しており、ランダム質量ではホモダ

イマーと非特異的ヘテロダイマーが存在しないことから、塩基対合は確かに高特異性であることが判明し、MALDIにより生成されるイオンで気相WC相互作用を維持できることが更に裏付けられた。

図98はe4対立遺伝子のMALDI-TOFスペクトルを示し、e3とは異なり、CfoI/RsaI消化により36/38量体対を生じないと予想された。e3及びe4の質量スペクトルは、図97Bの主要な22.89kDaフラグメントが図98には存在しない点を除いて同様であり、この情報だけ (表IX) でe3及びe4対立遺伝子は容易に区別され、MALDI-TOF MSによるdsDNAの直接測定により遺伝子型別できることが証明された。同様に、dsDNAをイオン化し、気相に移し、MALDI-TOF MSにより検出することができた。本装置で一般に使用した加速電圧は-5kVに過ぎず、試料ターゲットから-2mmまでで1.5kV/mmに対応し、電界強度は試料ターゲットからの距離と共に迅速に低下した。大半の従来の研究は少なくとも20kVの加

特表2002-507883

) Rapid Commun. Mass Spectrom. 8:183; Liuら (1995) Anal. Chem. 67:3482; Siegfertら (1996) Anal. Biochem. 243:55; 及びDoktyczら (1995) Anal. Biochem. 230:205) に一致したが、同様の条件下で合成DNAには無傷の2本鎖が観察された (図96A)。生物反応後により得られる鎖濃度を推定することは困難であるが、合成試料の二量化が生じた濃度よりは著しく低かったと予想される。更に、2成分合成混合物内で特異的ハイブリッドを維持するほうが消化産物からの1本鎖DNA成分20個の著しく複雑な混合物よりも反応速度の点で好ましいと思われる。

dsDNAの維持に及ぼす低温の効果を試験した。消化DNA溶液のアリコート、マトリックス、ピベット、ピベットチップ及びステンレス鋼試料ターゲットを4℃「冷蔵庫」に15分間保存し、通常の調製物と同様にマトリックス、次いで分析物をターゲットにスポットし、風乾しながら同時結晶させた。3

HPA (50%アセトニトリル) 300nLと分析物300nLの混合物は室温では~1分で結晶したが、低温では~15分かかった。冷蔵庫環境で調製した試料スポットは一般に高い割合で大きい透明結晶を含んでいた。

低温で調製したアポE消化産物アリコートのMALDI-TOF分析は、図97Bのスペクトルを生じた。低質量範囲は定性的に図97Aと似ているが、8kDaを超えると著しい相違が観察された。図97Aでは1本鎖に一致するシグナルは1個しか観察されなかった (表IX) が、冷蔵庫で調製した図97Bの試料は8kDa未満を除いて同一質量のシグナルを生じなかった。更に、図97Bには付加的な高質量ピークがあり、これらは明らかに低質量成分を含むダイマーピークに相当する。合成DNAの場合と同様に、これらが非特異的ヘテロダイマー、特異的WCヘテロダイマー又は非特異的ホモダイマーのいずれに相当するかを決定することが重要であった。まず33.35kDaフラグメントについて考察する。この高質量フラグメントがトライマー以上のマルチマーであるという可能性はあり得ないので問題外とすると、このフラグメントはダイマーとして最高質量即ち>16kDaのssDNA成分を含んでいるはず。

速を使用しており (Lecchiら (1995) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6:972)、唯一の例外として凍結マト

リックス溶液と100V加速を使用して27量体dsDNAが検出されている (Nelsonら (1990) Rapid Commun. Mass Spectrom. 4:348)。理論の裏付けはないが、MALDIにより誘導されるdsDNAの「変性」は、高加速電場を使用する場合に気相衝突活性化がWC対合を妨げるために生じると考えられ、エレクトロスプレーイオン化を使用してdsDNAの1本鎖成分を配列決定するために使用される断片化の第1段階と予想される変性に似ている (McLaffertyら (1996) Int. J. Mass Spectrom., Ion Processes)。溶液中でWC対合dsDNAを安定化するために必要な高い塩濃度 (一般に>10mM NaCl又はKCl) はMALDI分析には適していないと思われる (Nordhoffら (1993) Nucleic Acids Res. 21:3347)、カチオンにより付加されるMALDIシグナルを避けるためにはこのような不揮発性カチオンの濃度を下げる必要があるが、その結果、溶液中の2本鎖は不安定になる。マトリックス環境の低pH条件でもデュプレックスを不安定にすると思われる。図97B及び98に示すように、特に長い鎖の場合には水素結合網目

構造が広範囲であるために融点が高いため、低濃度の生物試料でも低温で保存及び調製するとこれらの変性効果を少なくとも部分的に回避できる。本実施例で使用した条件は非常に非ストリンジェントなアニーリング条件であると認められる。

高質量dsDNAピーク (例えば図97B、232kDa) の低質量テールは1本鎖の各々からの脱プリンに由来する。溶液中の脱プリンに起因する脱プリン反応であるか、3-HPA中の弱酸性条件は有意脱プリンを誘導せず、De-MALDI-TOFで測定した混合塩基50量体からの分子イオンシグナルに占める脱プリンピークの割合はほんの僅かであった (Juhazら (1996) Anal. Chem. 68:941)。気相dsDNAの

1本鎖成分からの脱プリンが観察され、これら塩基はその1本鎖の相補的塩基に結合した水素であるとも予想されるが、これは鎖が変性される前に共有結合が切断されていることを暗示している。

実施例27

塩基特異的リボヌクレアーゼの効率及び特異性アッセイ

選択した合成20～25量体の消化中に等時間間隔で抽出したアリコートをマススペクトロメトリーにより分析した。RN

アーゼの3種は効率的かつ特異的であることが判明した。これらはG特異的T₁、A特異的U₂及びA/U特異的P₁hyMであった。C特異的であると予想されるリボヌクレアーゼは信頼性が低いことが判明し、例えば全てのCを開裂した訳でなく、予想外にUも開裂した。これらの3種の有望なRNアーゼはいずれも全予想位置で開裂を生じ、完全な配列カバーが得られた。更に、1又は数個の非開裂位置(短いインキュベーション時間)を含む開裂産物の存在は開裂産物の整理を可能にした。合成20量体(配列番号114)RNAのT₁消化後に抽出したアリコートのMALDIスペクトルの1例を図100に示す。

実施例28

増幅DNAターゲットのシリコンウェーハ固定化

シリコン表面調製

シリコンウェーハをエタノールで洗浄し、ブンゼンバーナーで殺菌し、トルエン中25(容量)%3-アミノプロピトリエトキシシランの無水溶液に3時間浸漬した。次にシラン溶液を除去し、ウェーハをトルエンで3回、ジメチルスルホキシド(DMSO)で3回洗浄した。次にウェーハを無水DMSO中N-スクリンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエ

ート(STAB)(Pierce Chemical, Rockford, IL)の10mM無水溶液中でインキュベートした。反応後、S1AB溶液を除去し、ウェーハをDMSOで3回洗浄した。全ての場合に、ヨードアセトアミド官能化ウェーハをすぐに使用し、レーベルヨードアセトアミド官能基の加水分解を最

ウェーハの表面に結合した。完全なチオール脱プロトン化を確保するために、結合反応はpH8.0で実施した。ジスルフィドを開裂するために10mM TCEPを使用し、他の上記反応条件を使用すると、250fmol/mm²表面の表面密度を再現可能に得ることができた。

ハイブリダイゼーション及びMALDI-TOFマスペクトロメトリー

135bpチオール含有DNAと結合したシリコンウェーハを相補的12量体オリゴヌクレオチド(配列番号121)と共にインキュベートし、特異的にハイブリダイズしたDNAフラグメントをMALDI-TOF MS分析により検出した。12量体配列の理論質量対電荷比は3622.4Daであるが、質量スペクトルは3618.33の実測質量対電荷比でシグナルを生じた。

このように、5'-ジスルフィド結合を含む特定DNAターゲット分子を増幅することができる。本実施例に記載する方法を使用して、S1ABを結合したシリコンウェーハに分子を高密度で固定化し、特定相補的オリゴヌクレオチドをこれらのターゲット分子にハイブリダイズすると、MALDI-TOF

MS分析により検出することができる。

実施例29

核酸アレーを製作するための高密度核酸固定化の使用

実施例28に記載した高密度結合手順を使用し、その表面に例えば凹部やバッチ等の複数のロケーションをもつシリコンウェーハ上にMALDI-TOFマスペクトロメトリー分析可能なDNAオリゴマーのアレーを製作した。アレーを製作するために、ウェーハの選択ロケーションのみに遊離チオール含有オリゴヌクレオチドプライマーを固定化した(例えば実施例28参照)。アレーの各ロケーションに3種の異なるオリゴマーの1種を配置した。各固定化オリゴマーを別々に検出及び区別できることを立証するために、3種のオリゴマーの1種に相補的な異なる長さの3種の異なるオリゴヌクレオチドをウェーハ上のアレーにハイブリダイズし、MALDI-TOFマスペクトロメトリーにより分析した。

オリゴヌクレオチド

相補的オリゴヌクレオチド対の一方が3'又は5'-ジスルフィド結合を含む

小限にした。更に、ヨードアセトアミド官能基は感光性であるため、その後の全ウェーハ操作は暗所で実施した。

増幅チオール含有核酸の固定化

S1ABを結合したシリコンウェーハを使用して特定増幅DNAターゲット配列の特異的遊離チオール含有DNAフラグメントを分析した。112bpヒトゲノムDNA鎖型(Genebank Acc. No.: Z52259; 配列番号118)の3'領域に相補的な5'-ジスルフィド結合を含む23量体オリゴヌクレオチド(Operon Technologiesから購入; 配列番号117)をプライマーとして使用し、ゲノムDNAの5'末端の一部に相補的な市販49量体プライマー(Operon Technologiesから購入; 配列番号119)をPCRで併用し、DNAブブレックスの一方の鎖のみに結合した5'-ジスルフィド結合を含む135bpD

NA産物(配列番号120)を増幅した。

PCR増幅反応はAmplitaq GoldKit(Perkin Elmer Catalog No. N808-0249)を使用して実施した。要約すると、112bpヒトゲノムDNA鎖型200ngを23量体プライマー10μM及び市販49量体プライマー8μM、10mM dNTP、製造業者により提供される緩衝液中のAmplitaq Gold DNAポリメラーゼ1単位と共にインキュベートし、サーモサイクラーでPCRを実施した。

得られた増幅産物の5'-ジスルフィド結合を10mMトリス-(2-カルボキシメチル)ホスフィン(TCEP)(Pierce Chemical, Rockford, IL)で完全に還元し、遊離5'-チオール基を生成した。修飾オリゴヌクレオチドのジスルフィド還元は逆相PLCで保持時間のシフトを観察することによりモニターした。10mM TCEPの存在下で5時間後に、ジスルフィドは完全に遊離チオールに還元されることが判明した。ジスルフィド開裂直後に、修飾オリゴヌクレオチドをヨードアセトアミドで官能化したウェーハと共にインキュベートし、S1ABリンカーを介してシリコン

3組の相補的オリゴヌクレオチド対を合成した(Operon Technologies又はOligos

等から購入)。例えば、オリゴマー1[d(CTGATGCGTCGGATCATCTTTT-T-S)](配列番号122)は3'-ジスルフィド結合を含み、オリゴマー2[d(SS-CCTCTTGGGAAGCTGTGTAGTATT)](配列番号117)の5'-ジスルフィド誘導体とオリゴマー3[d(SS-GAATTCGAGCTCGGTACCCGG)](配列番号115)の5'-ジスルフィド誘導体は各々5'-ジスルフィド結合を含む。

オリゴマー1～3に相補的なオリゴヌクレオチドは、MALDI-TOF MS分析中に相互に容易に分解可能な異なる長さとなるようにデザインした。例えば、オリゴマー1の一部に相補的な23量体オリゴヌクレオチド(配列番号123)を合成し、オリゴマー2の一部に相補的な12量体オリゴヌクレオチド(配列番号121)を合成し、オリゴマー3の一部に相補的な21量体オリゴヌクレオチド(配列番号116)を合成した。更に、3種のオリゴマーのいずれにも相補性をもたない第4の29量体オリゴヌクレオチド(配列番号124)を合成した。この第4のオリゴヌクレオチドは陰性対照として使用した。

シリコン表面化学及びDNA固定化

(a) 4×4(16ロケーション)アレー

16×16ウェルアレー形態の256個の別個の凹部又はウェルをもつ2×2cm²シリコンウェーハを業者(Accelerator Technology Corp., College Station, Texas)から購入した。ウェルは800×800μm²、深さ120μm、1.125ピッチであった。シリコンウェーハを3-アミノプロピトリエトキシシランと反応させ、表面に第1級アミンの均質層を生成した後、ヘテロ2官能性架橋剤S1ABに暴露し、表面にヨードアセトアミド官能基を付けた(例えば実施例28参照)。

シリコンアレーの各ロケーションに結合するオリゴマーを調製するために、実施例28に記載したように10mM TCEPを使用して各オリゴマーのジスル

フィード結合を完全に還元し、DNAを100mMリン酸緩衝液(pH8.0)に10μMの終濃度で再懸濁した。ジスルフィド結合還元直後に、ほぼ上記実施例28に記載したようなプローブ結合条件を使用してウェーハ上の16個のロケーションのヨードアセトアミド官能基にオリゴマーの遊離チオール基を結合した。ウェーハの16個

の異なるロケーションに別々に結合するために、ウェーハの表面全体をオリゴヌクレオチド溶液でフラッシュするのではなく、ロボットピンツールを使用してウェーハ上の256個のウェルの16個のロケーション(即ち凹部)の各々に所定修飾オリゴマーの~30nMアリコートと並行して添加し、固定化DNAの4×4アレーを構築した。

ロボットピンツールはプローブブロックに収容してX、Y及びZロボット段に取り付けた16個のプローブから構成される。ロボット段はガントリーシステムとし、ロボットのアームの下に試料トレイを配置できるようにした。ガントリーユニット自体は、リニアオプティカルエンコーダーにより位置フィードバック可能なブラシレスリニアサーボモーターの案内下に夫々250及び400mm移動するX及びYアームから構成される。ガントリーユニットのxy軸スライドにはリードスクリュー駆動Z軸(50mm鉛直移動)が取り付けられており、モーター搭載ロータリーオプティカルエンコーダーにより位置フィードバック可能なオンラインロータリーサーボモーターにより制御される。システムの作業領域はマイクロタイタープレート5枚(大抵の場合は洗浄溶液プレート2枚と、最大1152種の異

なるオリゴヌクレオチド溶液の試料プレート3枚)と20×20mmウェーハ10枚までを保持するスライドアウトツールングプレートを用意する。ウェーハは2本のバンキングピンでプレートに精密に配置され、真空により固定される。システム全体は安全のためにプレキシガラスハウジングに収容され、熱及び振動緩衝用スチール支持フレームに取り付けられる。運動制御は3軸サーボコントローラーとした市販運動コントローラーにより行い、コンピューターに組み込み、必要

dit、ドイツから購入したシステムを改造し、分配しようとする溶液を保持するガラスキャピラリーを包囲するようにこれに結合した圧電エレメントにパルス信号を送る圧電エレメントドライバーと、キャピラリーに(負圧により)添加又は(正圧により)排出するための圧力トランスデューサーと、添加、排出、分配及び洗浄のためにキャピラリーを操作するロボットxyz段及びロボットドライバーと、「懸濁」液滴特性を検査できるように圧電エレメントの周波数でパルスされるストロブスコープ及びドライバーと、ソース及び指定プレート又は試料ターゲットのための別個の段(即ちSiチップ)と、指定プレートへの添加を検査するためにロボットアームに搭載されたカメラと、圧力ユニット、xyzロボット及び圧電ドライバーを制御するデータステーションを含む。

3-HPA溶液を周囲温度で乾燥させた後、圧電ピペットを使用して水の6nMアリコートを各ロケーションに加え、乾燥

マトリックス-DNA複合体を再懸濁し、マトリックス-DNA複合体を周囲温度で乾燥すると各ロケーションの底面に均質結晶表面を形成するようにした。

MALDI-TOF MS分析

図6に示すハイブリダイゼーションアレーの16個のロケーションの各々では実施例28に記載したようにMALDI-TOF MS分析を実施した。DNAハイブリダイゼーションの16個のロケーションの各々に特異的にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの質量スペクトルは、特定相補のヌクレオチド配列に対応する実測質量対電荷比を表す特異的なシグナルを各ロケーションに示した。

例えば、オリゴマー1を結合したロケーションのみで質量スペクトルは23量体にはほぼ等しい7072.4の実測質量対電荷比をもつ主要シグナルを示した(23量体の理論質量対電荷比は7072.6Da)。同様に、オリゴマー2を結合したロケーションのみに実測質量対電荷比3618.33Da(理論値3622.4Da)で12量体オリゴヌクレオチドの特異的なアレーハイブリダイゼーションが検出され、オリゴマー3を結合したアレーのロケーションのみにMJM6の特異的なハイブリ

特表2002-507883

に応じて特定アプリケーション用プログラミングコードを書き込む。

DNAアレーを構築するために、オリゴマー1~3の溶液を加えた多重ウェルDNA源プレートの16個のウェルに、ソリッドピンエレメントをもつアセンブリを用意するピンツールを浸してピンの遠端を浸し、ロボットアセンブリによりピンアセンブリをシリコンウェーハに移動し、表面接触により試料をスポットした。こうして、シリコンウェーハ上の256個のウェルのうちの16個の別個のウェルの各々に修飾オリゴマー1~3の1種を共有的に固定化し、固定化DNAの4×4アレーを形成した。

ハイブリダイゼーション反応の実施にあたっては、1M

NaClを加えたTE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA)1ml中各オリゴヌクレオチド10μMの終濃度で3種の相補的オリゴヌクレオチドと陰性対照オリゴヌクレオチドを混合し、溶液を65℃に10分間加熱した。直後にシリコンウェーハの表面全体を加熱オリゴヌクレオチド溶液800μlでフラッシュした。シリコンアレーを周囲温度で1時間、次いで4℃で少なくとも10分間インキュベートすることにより、相補的オリゴヌクレオチドを固定化オリゴマーにアニールした。あるいは、オリゴヌクレオチド溶液をウェーハに加えた後に加熱し、放冷させてハイブリダイズさせてもよい。

ハイブリダイズしたアニーリングを次に50mMクエン酸アモニウム緩衝液で洗浄し、カチオン交換してDNA主鎖上のナトリウム及びカリウムイオンを除去した(Piellesら(1993) Nucl. Acids Res. 21:3191-3196)。ロボット圧電シリアルディスペンサー(即ち圧電ピペットシステム)を使用してアレーの各ロケーションに3-ヒドロキシピコリン酸のマトリックス溶液(50%アセトニトリル中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸-10%クエン酸アン

モニウム; Wuら, Rapid Commun. Mass Spectrom. 7:142-146(1993))の6nMアリコートを順次加えた。

圧電ピペットシステムはMicrodrop GmbH, Nordersie

ダイゼーション(実測質量対電荷比6415.4)が検出された(理論値6407.2Da)。

アレーのロケーションのうちで陰性対照29量体オリゴヌクレオチドに対応するシグナル(理論質量対電荷比8974.8)を示したものは皆無であり、シリコンアレーの表面上の特定ロケーションに共有的に固定化したオリゴマーに特定ターゲットDNA分子をハイブリダイズできると考えられ、MALDI-TOF MS分析を使用して複数のハイブリダイズアッセイを個々にモニターできると考えられる。

(b) 8×8(64ロケーション)アレー

16×16ウェルアレー形態の256個の別個の凹部又はウェルをもつ2×2cm²シリコンウェーハを業者(Accelerator Technology Corp., College Station, Texas)から購入した。ウェルは800×800μm²、深さ120μm、1.125ピッチであった。シリコンウェーハを上述のように3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させ、表面に第1級アミンの均質層を生成した後、ヘテロ2官能性架橋剤S1ABに暴露し、表面にヨードアセトアミド官能基を付けた。

64素子アレーを構築するために、上記手順に従ってピンツールを使用した。オリゴマー1~3の溶液を加えた384ウェルDNAソースプレートの16個のウェルにピンツールを浸し、シリコンウェーハに移動し、表面接触により試料をスポットした。次に、ツールを洗浄溶液に浸し、ソースプレートの同一の16個のウェルに浸し、第1組の16個のスポットから2.25mm離れてターゲットにスポットし、完全なサイクルを繰り返し、各ピンから2×2アレーを構築し、スポットの8×8アレーを形成した(2×2エレメント/ピン×ピン16本=合計64エレメントにスポット)。

64個のロケーションに固定化したオリゴマー1~3を相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせ、MALDI-TOF MS分析により分析した。16ロケーションアレーの場合と同様に、DNAアレーのロケーションの各々に固定化チオール含有オリゴマーの各々に相補的オリゴヌクレオチドが特異的にハイ

ブリダイズしていることが判明した。

実施例30

シリコンウェーハに固定化したDNA鎖型に結合したハイブリダイズしたDNAプライマーの伸長

SIABを結合したシリコンウェーハを使用して、ほぼ実施例7に記載した手順に従って固定化DNA鎖型のプライマー伸長反応を行うこともできる。

3' 遊離チオール基を含む27量体オリゴヌクレオチド（配列番号125）をSIAB結合シリコンウェーハに例えば実施例28に記載したように結合した。12量体オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号126）を固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、市販キット（例えばSequenase又はThermoSequenase, U. S. Biochemical Corp）を使用してプライマーを伸長させた。製造業者の指示に従って緩衝液中で3種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP; dATP, dGTP, dCTP）とジデオキシリボヌクレオシドチミン三リン酸（ddNTP）の存在下にSequenase DNAポリメラーゼ又はThermoSequenase DNAポリメラーゼを加えると、12量体プライマーはシリコンウェーハに結合したまま3塩基伸長した。次に、ウェーハを上述のようにMALDI-TOFマスマススペクトロメトリーにより分析した。質量スペクトル結果は元の未伸長12量体から15量体（配列番号127）

をはっきりと区別し、シリコンウェーハの表面で特異的伸長を実施でき、MALDI-TOF MS分析により検出できることが分かった。

実施例31

シリコンウェーハに固定化したDNA鎖型に結合したハイブリダイズしたDNAプライマーのポリメラーゼ伸長に及ぼすリンカー長の効果

SIABを結合したシリコン表面とターゲットDNAを固定化オリゴマー鎖型にハイブリダイズすることにより形成されるデュプレックスDNAの間の距離の効果と酵素の選択を検討した。

プライマー伸長とマスマススペクトロメトリーによる伸長産物の分析を使用して、特定配列を含む固定化DNA分子を検出及び区別できることを立証する。

3' 一遊離チオール基を含む野生型アポリボタンパク質E遺伝子の対立遺伝子3のコーディング配列：5' -GCCTGGTACACTGCCAGGCGCTTCTGCAGGTCATCGGCATCGCGGAGGAG-3'（配列番号280）又はコドン158にG→A転位をもつ突然変異アポリボタンパク質E遺伝子：5' -GCCTGGTACACTGCCAGGCACTTCTGCAGGTCATCGGCATCGCGGAGGAG-3'（配列番号281）に相補的な50塩基合成DNA鎖型を実施例28に記載したように別々のSIAB結合シリコンウェーハに結合した。

21量体オリゴヌクレオチドプライマー：5' -GAT GCC GAT G AC CTG CAG AAG-3'（配列

番号282）を固定化鎖型の各々にハイブリダイズし、市販キット（例えばSequenase又はThermosequenase, U. S. Biochemical Corp）を使用してプライマーを伸長させた。製造業者の指示に従って緩衝液中で3種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP; dATP, dGTP, dTTP）とジデオキシリボヌクレオシドシチン三リン酸（ddCTP）の存在下にSequenase DNAポリメラーゼ又はThermosequenase DNAポリメラーゼを加えると、野生型アポリボタンパク質E遺伝子をコードする固定化鎖型に結合した21量体プライマーは1塩基伸長し、突然変異形態のアポリボタンパク質E遺伝子をコードする固定化鎖型に結合した21量体プライマーは3塩基伸長した。

本明細書に記載するようにマスマススペクトロメトリーによりウェーハを分析した。野生型アポリボタンパク質E配列は、質量対電荷比6771.17 Da（理論質量対電荷比6753.5 Da）をもつ1塩基伸長したプライマー（22量体）を質量対電荷比6499.64 Daの元の21量体プライマーから区別する質量スペクトルを生じた。突然変異アポリボタンパク質E

3' 末端に加えた3塩基ポリdTスペーサー配列以外は同一のDNA配列の2種の遊離チオール含有オリゴヌクレオチド：CTGATGCGTC GGATCATCTT TTTT（配列番号122）及びCTGATGCGTC GGATCATCTT TTTTTTT（配列番号125）の3' 末端に2種のSIAB結合シリコンウェーハを結合した。これらのオリゴヌクレオチドは合成し、各々別々にSIAB架橋剤によりシリコンウェーハの表面に固定化した（例えば実施例28参照）。両オリゴヌクレオチドに

共通のヌクレオチド配列の部分に相補的な12量体オリゴヌクレオチド：AAA AAGATG AT（配列番号126）、GATGATCCGA CG（配列番号128）、GATCCGACGC AT（配列番号129）と共に各ウェーハをインキュベートし、シリコンウェーハを75℃で変性させ、ゆっくりと冷却した。次にウェーハを上述のようにMALDI-TOFマスマススペクトロメトリーにより分析した。

上記実施例30に記載したように、デュプレックスと表面の間に9塩基スペーサーを加えたオリゴマープライマー（配列番号125）を使用すると、結合12量体オリゴヌクレオチドの3塩基特異的伸長が観察された。STAB部分とDNAデュプレックスの間のDNAスペーサー長が0、3、6及び12の場合にも同様の結果が観察された。更に、SequenaseやThermoSequenase（US Biochemical）等の種々のDNAポリメラーゼを使用して伸長反応を実施することもできる。例えば、SIABリンカーをDNA鎖型に直接結合してもよいし、ハイブリダイズしたDNAのプライマー伸長を実施せずにリンカーを加えてもよい。

実施例32

アポE遺伝子におけるスペクトロチップ突然変異検出

本実施例は診断目的で野生型及び突然変異アポリボタンパク質E遺伝子を検出するための固定化鎖型のハイブリダイゼーション、プライマー伸長及びマスマススペクトロメトリーに関する。本実施例は、未標識対立遺伝子特異的プライマーのプ

配列は、質量対電荷比7386.9 Da（理論質量対電荷比7386.9 Da）をもつ3塩基伸長したプライマー（24量体）を質量対電荷比6499.64 Daの元の21量体プライマーから区別する質量スペクトルを生じた。

実施例33

鎖置換及び固定化相補的核酸へのハイブリダイゼーションによる2本鎖核酸分子の検出

本実施例は、24量体プライマーの固定化とデュプレックスDNA分子の一方の鎖の特異的ハイブリダイゼーションに関し、選択されたターゲット分子を溶液相で増幅すると共に、2本鎖分子の検出を可能にする。この方法は単塩基変異の検出、特に2本鎖フラグメントのゲノムライブラリーのスクリーニングに有用である。

3' 一遊離チオール基を含む24量体プライマーCTGATGCGTC GGATCATCTT TTTT（配列番号122）を実施例29に記載したようにSIAB結合シリコンウェーハに結合した。

18量体合成オリゴヌクレオチド：5' -CTGATGCGTCGGATCATC-3（配列番号286）を、この18量

体の12塩基部分に相補的な配列をもつ12量体：5' -GATGATCCGACG-3'（配列番号285）とブレミックスした。オリゴヌクレオチドミックスを75℃まで加熱し、室温までゆっくりと冷却し、デュプレックス分子：

5'-CTGATGCGTCGGATCATC-3'（配列番号286）

3'-GCAGCCTAGTAG-5'（配列番号287）

の形成を助長した。

実施例30に記載したハイブリダイゼーション条件を使用してデュプレックス分子1 μMを混合することにより、デュプレックス分子の12量体鎖と固定化24量体プライマーの特異的ハイブリダイゼーションを実施した。

ウェーハを上述のようにマスマススペクトロメトリーにより分析した。12量体の質量スペクトルには質量対電荷比3682.78 Daで特異的ハイブリダイゼー

ションが検出された。

実施例34

1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4,4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)-1-オ-((2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

A. 2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)ベンズアルデヒド

3-ブロモ-1-プロパノール (3.34 g, 24 mmol) を無水アセトニトリル 80 ml 中で 5-ヒドロキシ-2-ニトロベンズアルデヒド (3.34 g, 20 mmol)、 K_2CO_3 (3.5 g) 及び KI (100 mg) の存在下に一晚 (15 時間) 還流させた。反応混合物を室温まで冷却し、塩化メチレン 150 ml を加えた。混合物を濾過し、固体残渣を塩化メチレンで洗浄した。有機溶液をあわせて蒸発乾燥し、塩化メチレン 100 ml に再溶解した。得られた溶液を飽和 $NaCl$ 溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶剤の減圧除去後に所望生成物 4.31 g (96%) が得られた。

$R_f=0.33$ (ジクロロメタン/メタノール, 95/5)。

UV (メタノール) 最大: 313, 240 (ショルダー), 215 nm; 最小: 266 nm。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 10.28 (s, 1H), 8.17 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.22 (s, 1H), 4.22 (t, 2H), 3.54 (t, 2H), 1.90 (m, 2H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 189.9, 153.0, 141.6, 134.3, 127.3, 118.4,

114.0, 66.2, 56.9, 31.7。

B. 2-ニトロ-5-(3-オ-1-ブチルジメチルシリルプロポキシ)ベンズアルデヒド

2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)ベンズアルデヒド (1 g, 4.44 mmol) を無水アセトニトリル 50 ml に溶かした。この溶液にトリエ

成物が単離された。

$R_f=0.375$ (ヘキサン/酢酸エチル, 5/1)。

UV (メタノール) 最大: 306, 233, 206 nm; 最小: 255, 220 nm。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.00 (d, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 5.49 (b, OH), 5.31 (q, 1H), 4.19 (m, 2H), 3.77 (t, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.37 (d, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 162.6, 146.2, 139.6, 126.9, 112.9, 112.5, 64.8, 63.9, 58.7, 31.5, 25.6, 24.9, -3.4, -5.8。

D. 1-(2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)フェニル)エタノール

1-(2-ニトロ-5-(3-オ-1-ブチルジメチルシリルプロポキシ)フェニル)エタノール (0.89 g, 2.5 mmol) を THF 30 ml に溶かし、 nBu_4NF 0.5 mmol

を攪拌下に加えた。混合物を室温で 5 時間攪拌し、溶剤を減圧除去した。塩化メチレン中勾配メタノールを使用して残渣をシリカゲルカラムで精製した。1-(2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)フェニル)エタノール 0.6 g (99%) が得られた。

$R_f=0.17$ (ジクロロメタン/メタノール, 95/5)。

UV (メタノール) 最大: 304, 232, 210 nm; 最小: 255, 219 nm。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.00 (d, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 5.50 (d, OH), 5.28 (t, OH), 4.59 (t, 1H), 4.17 (t, 2H), 3.57 (m, 2H), 1.89 (m, 2H), 1.36 (d, 2H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 162.8, 146.3, 139.7, 12

チルアミン 1 ml、イミダゾール 200 mg 及び $tBDMSCl$ 0.8 g (5.3 mmol) を加えた。混合物を室温で 4 時間攪拌した。メタノール (1 ml) を加えて反応を停止した。溶剤を減圧除去し、固体残渣を塩化メチレン 100 ml に再溶解した。得られた溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄後、水洗した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶剤を減圧除去した。塩化メチレンを用いて粗混合物をクイックシリカゲルカラムで精製すると、2-ニトロ-5-(3-オ-1-ブチルジメチルシリルプロポキシ)ベンズアルデヒド 1.44 g (96%) が得られた。

$R_f=0.67$ (ヘキサン/酢酸エチル, 5/1)。

UV (メタノール) 最大: 317, 243, 215 nm; 最小: 235, 267 nm。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 10.28 (s, 1H),

8.14 (d, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.20 (t, 2H), 3.75 (t, 2H), 1.90 (m, 2H), 0.85 (s, 9H), 0.02 (s, 6H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 189.6, 162.7, 141.5, 134.0, 127.1, 118.2, 113.8, 65.4, 58.5, 31.2, 25.5, -3.1, -5.7。

C. 1-(2-ニトロ-5-(3-オ-1-ブチルジメチルシリルプロポキシ)フェニル)エタノール

高減圧乾燥した 2-ニトロ-5-(3-オ-1-ブチルジメチルシリルプロポキシ)ベンズアルデヒド (1.02 g, 3 mmol) を無水塩化メチレン 50 ml に溶かした。トルエン (3 ml) 中 2 M トリメチルアルミニウムを 10 分以内で滴下し、反応混合物を室温に維持した。更に 10 分間攪拌し、混合物を氷冷水 10 ml に注いだ。水相からエマルジョンを分離し、硫酸ナトリウム 100 g で乾燥し、残留水を除去した。溶剤を減圧除去し、塩化メチレン中勾配メタノールを使用して混合物をシリカゲルカラムで精製した。0.94 g (86%) の所望生

成物が得られた。

UV (メタノール) 最大: 306, 233, 206 nm; 最小: 255, 220 nm。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.00 (d, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 5.49 (b, OH), 5.31 (q, 1H), 4.19 (m, 2H), 3.77 (t, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.37 (d, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 162.6, 146.2, 139.6, 126.9, 112.9, 112.5, 64.8, 63.9, 58.7, 31.5, 25.6, 24.9, -3.4, -5.8。

$R_f=0.50$ (ジクロロメタン/メタノール, 99/1)。

UV (メタノール) 最大: 350 (ショルダー), 305, 283, 276 (ショルダー), 233, 208 nm; 最小: 290, 258, 220 nm。

1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.00 (d, 1H), 6.82-7.42 (ArH), 5.52 (d, OH), 5.32 (m, 1H), 4.23 (t, 2H), 3.71 (s, 6H), 3.17 (t, 2H), 2.00 (m, 2

H), 1.37 (d, 3H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 162.5, 157.9, 157.7, 146.1, 144.9, 140.1, 139.7, 135.7, 129.5, 128.8, 127.6, 127.5, 127.3, 126.9, 126.4, 113.0, 112.8, 112.6, 85.2, 65.3, 63.9, 59.0, 54.8, 28.9, 24.9。

F. 1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4,4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)-1-オ-((2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノ

ホスフィノ) エタン

1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)エタノール(400mg, 0.74mmol)を高減圧下に乾燥し、無水塩化メチレン20mlに溶かした。この溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン0.5mlと2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト0.3ml(1.34mmol)を加えた。反応混合物を室温で30分間攪拌し、メタノール0.5mlを加えて反応を停止した。混合物を飽和重炭酸ナトリウム溶

液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶剤を減圧除去し、トリエチルアミン数滴を含む塩化メチレン中1%メタノールを使用してクイックシリカゲルカラムで精製すると、所望のホスホアミダイト510mg(93%)が得られた。

$R_f=0.87$ (ジクロロメタン/メタノール, 99/1)。

実施例35

1-(4-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-オ-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

A. 4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシアセトフェノン

3-プロモ-1-プロパノール(53ml, 33mmol)を無水アセトニトリル100ml中で4-ヒドロキシ-3-メトキシアセトフェノン(5g, 30mmol)、 K_2CO_3 (5g)及びKI(300mg)の存在下に一晩(15時間)還流させた。室温まで冷却後、反応混合物に塩化メチレン(150ml)を加えた。混合物を濾過し、固体残渣を塩化メチレンで洗浄した。有機溶液をあわせて蒸発乾燥し、塩化メチレン100mlに再溶解した。得られた溶液を飽和NaCl溶液で洗浄し、

硫酸ナトリウムで乾燥した。溶剤の減圧除去後に所望生成物6.5g(96.4%)が得られた。

$R_f=0.41$ (ジクロロメタン/メタノール, 95/5)。

C. 4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン

4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシアセトフェノン(3.99g, 15mmol)を水浴中70% HNO_3 15mlに滴下し、反応温度を室温に維持した。反応混合物を室温で30分間攪拌し、碎氷30gを加えた。この混合物をジクロロメタン100mlで抽出し、有機相を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶剤を減圧除去した。塩化メチレン中勾配メタノールを使用して粗混合物をシリカゲルカラムで精製すると、所望生成物4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン3.8g(81.5%)とイソプロ置換生成物5-(3-アセトキシプロポキシ)-4-メトキシ-1, 2-ジニトロベンゼン0.38g(8%)が得られた。

イソプロ置換副生物5-(3-アセトキシプロポキシ)-4-メトキシ-1, 2-ジニトロベンゼン:

$R_f=0.47$ (ジクロロメタン/メタノール, 99/1)。

UV (メタノール) 最大: 334, 330, 270, 240, 211nm; 最小: 310, 282, 263, 223nm。

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.36 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 4.28 (t, 2H), 4.18 (t, 2H), 4.02 (s, 3H), 2.20 (m, 2H), 2.08 (s, 3H)。

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 170.9, 152.2, 151.1, 117.6, 111.2, 107.9, 107.1, 66.7, 60.6, 56.9, 28.2, 20.9。

所望生成物4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン:

$R_f=0.29$ (ジクロロメタン/メタノール, 99/1)。

UV (メタノール) 最大: 344, 300, 246, 213nm; 最小: 320, 270, 227nm。

UV (メタノール) 最大: 304, 273, 227, 210nm; 最小: 291, 244, 214nm。

1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 7.64 (d, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.04 (d, 1H), 4.58 (b, OH), 4.12 (t, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.56 (t, 2H), 2.54 (s, 3H), 1.88 (m, 2H)。

^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 196.3, 152.5, 148.6, 129.7, 123.1, 111.5, 110.3, 65.4, 57.2, 55.5, 31.9, 26.3。

B. 4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシアセトフェノン

4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシアセトフェノン(3.5g, 15.6mmol)を乾燥し、無水アセトニトリル80mlに溶かした。この混合物にトリエチルアミン

6mlと無水酢酸6mlを加えた。4時間後にメタノール6mlを加え、溶剤を減圧除去した。固体残渣をジクロロメタン100mlに再溶解し、溶液を希重炭酸ナトリウム溶液で洗浄後、水洗した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶剤を除去した。塩化メチレンを使用して固体残渣をシリカゲルカラムで精製すると、4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシアセトフェノン4.1g(98.6%)が得られた。

$R_f=0.22$ (ジクロロメタン/メタノール, 99/1)。

UV (メタノール) 最大: 303, 273, 227, 210nm; 最小: 290, 243, 214nm。

1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 7.62 (d, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.08 (d, 1H), 4.12 (m, 4H), 3.82 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.04 (m, 2H), 2.00 (s, 3H)。

^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 196.3, 170.4, 152.5, 148.6, 130.0, 123.0, 111.8, 110.4, 65.2, 60.8, 55.5, 27.9, 26.3, 20.7。

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.62 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.28 (t, 2H), 4.20 (t, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.20 (m, 2H), 2.08 (s, 3H)。

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 200.0, 171.0, 154.3, 148.4, 138.3, 133.0。

108.8, 108.0, 66.1, 60.8, 56.6, 30.4, 28.2, 20.9。

D. 1-(4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール

4-(3-アセトキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン(3.73g, 12mmol)にエタノール150mlと K_2CO_3 6.5gを加えた。混合物を室温で4時間攪拌し、ジクロロメタン中5%メタノールを用いてTLCにかけると反応が完了したことを示した。この同一反応混合物にNaBH₄ 3.5gを加え、混合物を室温で2時間攪拌した。アセトン(10ml)を加え、残りのNaBH₄と反応させた。溶剤を減圧除去し、残渣をシリカゲル50gに吸収させた。塩化メチレン中5%メタノールを使用してシリカゲルカラムの頂部にシリカゲル混合物を加えると、所望生成物1-(4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール3.15g(97%)が得られた。

脱保護後の中間生成物(4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン:

$R_f=0.60$ (ジクロロメタン/メタノール, 95/5)。

最終生成物1-(4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール:

$R_f=0.50$ (ジクロロメタン/メタノール, 95/5)。

UV (メタノール) 最大: 344, 300, 243, 219nm; 最小: 317, 264, 233nm。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7.54 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 5.47 (d, OH), 5.27 (m, 1H), 4.55 (t, OH), 4.05 (t, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.55 (q, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.37 (d, 3H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 153.4, 146.4, 138.8, 137.9, 109.0, 108.1, 68.5, 65.9, 57.2, 56.0, 31.9, 29.6。

E. 1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール

1-(4-(3-ヒドロキシプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール (0.325g, 1.2mmol) を無水ピリジンと2回共蒸発させ、無水ピリジン15ml

に溶かした。溶液を氷水浴で冷却し、DMTCI 450mg (1.33mmol) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌し、メタノール0.5mlを加えて反応を停止した。溶剤を減圧除去し、残渣をトルエンと2回共蒸発させ、ピリジンを完全に除去した。トリエチルアミン数滴を含む塩化メチレン中勾配メタノールを使用して最終残渣をシリカゲルカラムで精製すると、所望生成物1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール605mg (88%) が得られた。

$R_f=0.50$ (ジクロロメタン/メタノール, 95/5)。

UV (メタノール) 最大: 354, 302, 282, 274, 233, 209nm; 最小: 322, 292, 263, 222nm。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7.54 (s, 1H), 6.8-7.4 (ArH), 5.48 (d, OH), 5.27 (m, 1H), 4.16 (t, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (s, 6H), 3.15 (t, 2H), 1.98 (t, 2H), 1.37 (d, 3H)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 157.8, 153.3,

91参照)により光開裂性リンカーを含むオリゴヌクレオチド結合体を調製した。更に、より長い結合時間を使用して光開裂性単位と5'末端アミノ基を取

り込ませた。遊離したDMTカチオンの吸光度を測定することにより結合効率を検出した結果、ホスホロアミダイト1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)フェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン又は1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンの結合効率は慣用ヌクレオシドホスホロアミダイトと同等であることが判明した。塩基保護の脱保護と、固体支持体からの結合体の遊離は濃アンモニウムを用いて55℃で一晩行った。他の結合体の塩基保護の脱保護はAMA試薬による迅速脱保護により行った。0.1M酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7.0) とアセトニリル勾配 (20分間で5%→25%) を使用してHPLC (トリチル- o -n) によりMMT- o -n結合体上のを精製した。MMT又はCMT保護結合体を集めて減量し、80%酢酸水溶液で脱トリチル化 (40分間、0℃) し、脱塩し、-20℃で保存した。

実施例37

光分解試験

典型例では、蒸留水200 μ l中に光開裂性リンカーを含むオリゴヌクレオチド結合体2nmolに長波長UVランプ (Blak Ray, XX-15UVランプ, Ultraviolet products, San Gabriel, CA) で10cmの距離で照射した (放射ピーク365nm, 距離31cmのランプ強度=1.1mW/cm²)。0.1M酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7.0) とアセトニリル勾配を使用するHPLC (トリチル- o -ff) により、得られた混合物を分析した。分析の結果、結合体はUV照射数分以内にリンカーから開裂することが判明した。

等価物

146.1, 144.9, 138.7, 137.8, 135.7, 129.4, 128.7, 127.5, 127.4, 126.3, 112.9, 112.6, 108.9, 108.2, 85.1, 65.7, 63.7, 59.2, 55.8, 54.8, 29.0, 25.0。

F. 1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール (200mg, 3.5mmol) を高減圧下に乾燥し、無水塩化メチレン15mlに溶かした。この溶液にN, N-ジイソプロピルエチルアミン0.5mlと2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト0.2ml (0.89mmol) を加えた。反応混合物を室温で30分間攪拌し、メタノール0.5mlを加えて反応を停止した。混合物を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶剤を減

圧除去し、トリエチルアミン数滴を含む塩化メチレン中1%メタノールを使用してクイックシリカゲルカラムで精製すると、所望のホスホロアミダイト1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン247mg (91.3%) が得られた。

$R_f=0.87$ (ジクロロメタン/メタノール, 99/1)。

実施例38

オリゴヌクレオチド合成

標準条件下で固相核酸合成 (Sinha, Tetrahedron Lett. 1983, 24, 5843-5846; Sinha, Nucleic Acids Res. 1984, 12, 4539-4557; Beaucage, Tetrahedron 1993, 49, 6123-6194; 及び Matteucci, J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 3185-31

当業者は単に日常実験を使用して本明細書に記載した特定方法の多数の等価物を認識又は確認することができよう。このような等価物は本発明の範囲に含まれるとみなされ、以下の請求の範囲により保護される。

配列

ハイボセティカル配列:No

配列番号:1

アンチセンス:No

配列の長さ:20

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

GTGTGAAGGG TTCATATGC

19

配列の種類:cDNA

配列番号:3

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:28

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

GCAAGTGAAT CCTGAGCGTG

20

ハイボセティカル配列:No

配列番号:2

アンチセンス:No

配列の長さ:19

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

ATCTATATTC ATCATAGGAA ACAACACA

28

配列の種類:cDNA

配列番号:4

配列の長さ:30

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

GCTTTGGGCG ATGGACATTG ACCCGTATAA

30

配列の種類:cDNA

配列番号:6

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:30

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

GTATCTATAT TCATCATAGG AAACACCAT

30

ハイボセティカル配列:No

配列番号:5

アンチセンス:No

配列の長さ:30

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CTGACTACTA ATTCCCTGGA TGCTGGGTCT

30

配列の種類:cDNA

配列番号:7

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:20

アンチセンス:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTGCCTGAGT GCAGTATGGT

20

配列番号:8

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGCAACGACT GTTGCCTGGC CACTTG

26

配列番号:11

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TACATTCCCA ACCGCTGGC ACAAC

25

配列

AGCTCTATAT CGGGAAGCCT

20

配列番号:9

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTGTGCCACG CGGTTCGGA TGTA

24

配列番号:10

配列の長さ:26

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列番号:12

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AACTGGGGG CAAACACTCG TTCT

25

配列番号:13

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCAAGTGAAT OCTGAGCGTG

20

配列番号:14

配列の長さ:14

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTGTGAAGGG CGTG

14

配列番号:15

配列の長さ:24

起源:

配列

GTCACCTCG ACGTCAG

18

配列番号:17

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTGTAAACG ACGGCCAGT

19

配列番号:18

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTATATTCAT CATAGGAAC ACCA

24

配列番号:16

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTTCACCGC GATGTTGA

18

配列番号:19

配列の長さ:17

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

| | | | |
|---|----|--|----|
| CAGGAACAG CTATGAC | 17 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:20 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:17 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トポロジー:不明 | | GTCACCCCTCG ACCTGCAGC | 19 |
| 配列の種類:cDNA | | 配列番号:22 | |
| ハイボセティカル配列:No | | 配列の長さ:20 | |
| アンチセンス:No | | 配列の型:核酸 | |
| フラグメント型: | | 鎖の数:一本鎖 | |
| 起源: | | トポロジー:不明 | |
| 配列 | | 配列の種類:cDNA | |
| GTAAACGAC GGCCAGT | 17 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:21 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:19 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トポロジー:不明 | | GTGTAAAC GAGGGCCAGT | 20 |
| 配列の種類:cDNA | | | |
| | | | |
| | | | |
| 配列番号:23 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:39 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トポロジー:不明 | | TGTACGTCAC AACT | 14 |
| 配列の種類:cDNA | | 配列番号:25 | |
| ハイボセティカル配列:No | | 配列の長さ:78 | |
| アンチセンス:No | | 配列の型:核酸 | |
| フラグメント型: | | 鎖の数:一本鎖 | |
| 起源: | | トポロジー:不明 | |
| 配列 | | 配列の種類:cDNA | |
| TCTGGCCCTGG TGCAGGCCCT ATTGTAGTTG TGACGTACA | 39 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:24 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:14 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トポロジー:不明 | | AAGATCTGAC CAGCGATTGG GTTACCGTGA CTGCTGCTGC TCGTCTGCT GCTGGATGAT | 60 |
| 配列の種類:cDNA | | CCGACGCATC AGATCTGG | |
| ハイボセティカル配列:No | | | |

配列番号:26

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATCGTC GGATCATC

18

配列番号:27

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CGCATCAG CTC

23

配列番号:28

配列の長さ:33

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCGGTCCAA GAGCTGTGAT GCGTCGGATC ATC

33

配列番号:29

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CGCATCAG CTC

23

配列番号:30

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTGATCGTC GGATCATC

18

配列番号:31

配列の長さ:15

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCGGTCCAA GAGCT

15

配列番号:32

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CATTTCCTTC TGACACAACT G

21

配列番号:33

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TOCTTACTTA ACCCACTGTG

20

配列番号:36

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CACACTATGT AATACTATGC

20

CTTCTCTGTC TCACATGC

19

配列番号:34

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TC

12

配列番号:35

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:37

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GAAAAATATCT GACAAACTCA TC

22

配列番号:38

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:Kc

フラグメント型:

起源:

配列

CATGGACACC AAATTAAGTT C

21

配列番号:39

配列の長さ:14

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGAGACTCTG ICTC

14

配列番号:40

配列の長さ:15

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTCCCCAAAT CCTG

15

配列番号:41

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GGCAGGCGCTGCCAAGGAG

19

配列番号:42

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGGCGGCGCTCGGGCCCTC

20

配列番号:43

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCGGACATGG AGGACCTG

18

配列番号:44

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATCCGATG ACCTGCAGAA G

21

ハイボセティカル配列:No

配列番号:45

アンチセンス:No

配列の長さ:24

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

AATCCGTGCA GCAGAGTT

18

配列の種類:cDNA

配列番号:47

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:20

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

CCCTTACCTT TACCTTACC CTAA

24

ハイボセティカル配列:No

配列番号:46

アンチセンス:No

配列の長さ:18

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

TGTCAGAGCT GGACAACTGT

20

配列の種類:cDNA

配列番号:48

アンチセンス:No

配列の長さ:20

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CTGGGACCAG GTGTACCCCC

20

配列の種類:cDNA

配列番号:50

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:21

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

GATATGTGTCT TCCCGGTAGC

20

ハイボセティカル配列:No

配列番号:49

アンチセンス:No

配列の長さ:20

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CCTGTACTGG AAGGCGATCT C

21

配列の種類:cDNA

配列番号:51

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CATGAAGCAG AGCATACCCA

20

配列番号:52

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATCCACTGT GCGAAGAGC

19

配列番号:55

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

GACAGCAGCA CCGAGACGAT

20

配列番号:53

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CCGCTGCGAT CACCGTCCGG

20

配列番号:54

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

GCGGCTGCGA TCACCGTGC

19

配列番号:56

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TC

12

配列番号:57

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGTGCTCCT GC

12

配列番号:58

配列の長さ:39

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GAGTCAGGTG GGGCATGCCT CAAACAGACA CCATGGGCG

39

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACCTAGCGTT CAGTTGACT GAGATAATAC GACTCACTAT AGCAGCTCTC ATTTTCATA
C

60

61

配列番号:61

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AACTAGCCA TGTGCACAAC A

21

配列番号:59

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCTCTGTCTC CACATGCCCA G

21

配列番号:60

配列の長さ:61

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列番号:62

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

UCCGGUCUGA UGAGUCCGUG AGGAC

25

配列番号:63

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GUACUACAG GUGAGUCCA

20

配列番号:64

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CCAUGCGAGA GUAGUAGUA

20

配列番号:65

配列の長さ:50

起源:

配列

CATTTGCTC TGACAACT

20

配列番号:67

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCTCTGCTC CACATGCCA G

21

配列番号:68

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGGCCUGCG CAAGACGAA AGACCAUGU CCCUACUUG CCGCAGGAUC

50

配列番号:66

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTCGTCCCAT GGTGCACCTG ACTC

24

配列番号:69

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGCTGTGGTG AGGCCCTGGG CA

22

ハイボセティカル配列:No

配列番号:70

アンチセンス:No

配列の長さ:24

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

ACAGCGGACT GCTACCTGAC TCCA

24

配列の種類:cDNA

配列番号:72

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:18

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

GACGAGGACT GCTACCTGAC TCCA

24

ハイボセティカル配列:No

配列番号:71

アンチセンス:No

配列の長さ:24

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

TGGAGTCAGG TAGCAGTC

18

配列の種類:cDNA

配列番号:73

アンチセンス:No

配列の長さ:19

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

AGCCCCAAGA TGACTATC

18

配列の種類:cDNA

配列番号:75

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:21

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

CAGCTCTCAT TTTCATAC

19

ハイボセティカル配列:No

配列番号:74

アンチセンス:No

配列の長さ:18

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CGAGGAGCTC AAGGCCATGAA T

21

配列の種類:cDNA

配列番号:76

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CAGGGGCGAGC TCAGCTCTC

19

配列番号:77

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTTACTTGAA TTCCAAGAGC

20

配列番号:80

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

GGCACGGCTG TCCAAGGA

18

配列番号:78

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGGCCGGGCT CGCGGCCCTC

20

配列番号:79

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

GGGCTGACTT GCATGGACG GA

22

配列番号:81

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGCCAGGACA AG

12

配列番号:82

配列の長さ:15

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACAGCAGGAA CAGCA

15

配列番号:83

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCGGACATGG AGGACGTG

18

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTGCCCTGCA GCTTCACTGA AGAC

24

配列番号:86

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGCCAGGACA AG

12

配列番号:87

配列の長さ:14

配列番号:84

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGCCGATG ACCTGCAGAA G

21

配列番号:85

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGCCAGGACA AGTC

14

配列番号:88

配列の長さ:13

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGCCAGGACA AGA

13

配列番号:89

配列の長さ:15

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACAGCACCAA CAGCA

15

配列番号:90

配列の長さ:17

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACAGCAGGAA CAGCATC

17

配列番号:91

配列の長さ:16

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACAGCAGGAA CAGCAG

16

配列番号:92

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCGGACATGG AGGACGTG

18

配列番号:93

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCGGACATGG AGGACGTGGC

20

配列番号:94

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCGGACATGG AGGACGTGC

19

配列番号:95
 配列の長さ:21
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 GATGCCGATG ACCTGCAGAA G
 21
 配列番号:96
 配列の長さ:22
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 GTGCCCTGCA GCTTCACTGA AGAC
 24
 配列番号:99
 配列の長さ:26
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:

アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 GATGCCGATG ACCTGCAGAA GC
 22
 配列番号:97
 配列の長さ:23
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 GATGCCGATG ACCTGCAGAA GTG
 23
 配列番号:98
 配列の長さ:24

起源:
 配列
 GTGCCCTGCA GCTTCACTGA AGACTG
 26
 配列番号:100
 配列の長さ:25
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 GTGCCCTGCA GCTTCACTGA AGACC
 25
 配列番号:101
 配列の長さ:19
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TATCTGTTCA CTGTGCC

19

配列番号:102

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CAGAGGCTG GGGACCTG

19

配列番号:103

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACGACAGGGC TGGTGCC

18

配列番号:104

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACTGACAAC ACCCTTAAC

19

配列番号:105

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGCTTGCCA CAGGTCTC

18

配列番号:106

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CACAGAGGC CAGTGTGC

18

配列番号:107

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GGACCTGATT TCCTTACTG

19

配列番号:108

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGAATCTGAG GCATAACTG

19

配列番号:109

配列の長さ:50

起源:

配列

GTAAAGCGAC GGCCAGTGTG TACGCA

27

配列番号:111

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TACTGGAGG CGATCTCAGC AATCAGC

27

配列番号:112

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTGGGTACAC ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GCAAAACCCCT

50

配列番号:110

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GGCAGGGCTG TCCAAGGAG

19

配列番号:113

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGGCGCGGCT GGGCGCCCTC

20

配列番号:114

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GUCACUACAG GUGAGUCCA

20

配列番号:115

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:117

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CCTCTGGGA ACTGTGTAGT ATT

23

配列番号:118

配列の長さ:112

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GAATTGAGC TCGTACCCG G

21

配列番号:116

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CCGGGTACCG AGCTCGAATT C

21

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGGCTGTCTC TCTCCCTCTC TCATACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC
ACACACACAC TCACACTCAC CCACANNNAA ATACTACACA GTTCCCAAGA GG

60

112

配列番号:119

配列の長さ:49

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TAATACGACT CACTATAGGG CGAAGGCTGT CTCTCTCCCT CTCTCATAC

49

配列番号:120

配列の長さ:135

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TAATACGACT CACTATAGGG CGAAGGCTGT CTCCTCCCT CTCATACA CACACACACA 60
 CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACTCAGACT CACCCACANN NAAATACTAC 120
 ACAGTTCCCA AGAGG 135

配列番号:121

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AATACTACAC AG 12

配列番号:122

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATCGCTC GGATCATCTT TTTT 24

配列番号:123

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CGCATCAGAA TGT 23

配列番号:124

配列の長さ:29

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATCTAGCTG GCGCGAGCTA GGCCGTTCGA 29

配列番号:125

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATCGCTC GGATCATCTT TTTTTT 27

配列番号:126

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CG

12

配列番号:127

配列の長さ:15

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATCCGACGC AT

12

配列番号:130

配列の長さ:253

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

GATGATCCGA CGCAT

15

配列番号:128

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AAAAAGATG AT

12

配列番号:129

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

GGCAGGCTG TCCAAGGAGC TGCAGGGGC GCAGGCCCGG CTGGGCGCGG ACATGGAGGA 50
 CGTGTGCGGC CGCCTGGTGC AGTACGGGG CGAGGTGCAG GCCATGCTCG GCCAGAGCAC 120
 CGAGGAGCTG CGGGTGCGCC TCGCCTDCCA CCTGCGCAAG CTGCGTAAGC GGTCTCTCCG 180
 CGATGCGCAT GACCTGCAGA AGTGCCTGGC AGTGTACAG GCCGGGCCCC GCGAGGGCGC 240
 CGAGCGCGGC CTC 253

配列番号:131

配列の長さ:58

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GAATTACATT CCCAACCGCG TGGCACAACA ACTGGCGGGC AACAGTGT TGTGATT 58

配列番号:132

配列の長さ:57

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACCATTAAG AAAATATCAT CTTTGGTGT TCCTATGATG AATATAGAAG CGTCAT 57

配列番号:133

配列の長さ:29

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTATATTTCAT CATAGGAAAC ACCAAGAT 29

配列番号:136

配列の長さ:38

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTATATTTCAT CATAGGAAAC ACCAAGATG ATATTTC 38

配列

CTATATTTCAT CATAGGAAAC ACCAAGAT 29

配列番号:134

配列の長さ:26

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTATATTTCAT CATAGGAAAC ACCAAT 26

配列番号:135

配列の長さ:29

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列番号:137

配列の長さ:35

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTATATTTCAT CATAGGAAAC ACCAATG ATATTTC 35

配列番号:138

配列の長さ:35

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTATATTTCAT CATAGGAAC ACCAAAGATA TTTTC 35
 配列番号:139
 配列の長さ:31
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTATATTTCAT CATAGGAAC ACCAAAGATG C 31
 配列番号:140
 配列の長さ:200

アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 GTCACCCCTCG AACTGACGCC CAAGCTTGGG ATCCAGCACC ATCACCATCA CTAATAATGC 60
 ATGGGCTGCA GCGAATTGGC ACTGGCCGTC GTTTTACAA 99
 配列番号:142
 配列の長さ:15
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 TGTACGTGAC AACTA 15

配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTGCCACCGC GATGTTGATG ATTATGTGTC TGAATTGAT GGGGGCAGGC GGGCCCCGTC 60
 TGTGTGTCGC GGGTCTGGTG TTGATGGTGG TTTCTGCTCTGTC GACCTGCAGC 120
 CCAAGCTTGG GATCCACCAC CATCACCATC ACTAATAATG CATGGGCTGC AGGCAATTGG 180
 CACTGGCCGT CGTTTACAA 200
 配列番号:141
 配列の長さ:99
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 配列番号:143
 配列の長さ:16
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 TGTACGTGAC AACTAC 16
 配列番号:144
 配列の長さ:17
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACA

17

配列番号:145

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAA

18

配列番号:146

配列の長さ:19

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA

20

配列番号:148

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA G

21

配列番号:149

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAAT

19

配列番号:147

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GG

22

配列番号:150

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGC

23

ハイボセティカル配列:No

配列番号:151

アンチセンス:No

配列の長さ:24

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCC

25

配列の種類:cDNA

配列番号:153

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:26

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCC

24

ハイボセティカル配列:No

配列番号:152

アンチセンス:No

配列の長さ:25

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCT

26

配列の種類:cDNA

配列番号:154

アンチセンス:No

配列の長さ:27

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTGC

28

配列の種類:cDNA

配列番号:156

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:29

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTG

27

ハイボセティカル配列:No

配列番号:155

アンチセンス:No

配列の長さ:28

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTGCA

29

配列の種類:cDNA

配列番号:157

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCTGCAC

30

配列番号:158

配列の長さ:31

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCTGCAC CAG

33

配列番号:161

配列の長さ:34

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCTGCAC C

31

配列番号:159

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCTGCAC CA

32

配列番号:160

配列の長さ:33

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCTGCAC CAGG

34

配列番号:162

配列の長さ:35

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCTGCAC CAGGC

35

配列番号:163

配列の長さ:36

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTGCAC CAGGCC

36

配列番号:164

配列の長さ:37

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTGCAC CAGGCCA

37

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTGCAC CAGGCCAGA

39

配列番号:167

配列の長さ:19

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCC

19

配列番号:168

配列の長さ:20

配列番号:165

配列の長さ:38

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGTACGTCAC AACTACAATA GGCCCTGCAC CAGGCCAG

38

配列番号:166

配列の長さ:39

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA

20

配列番号:169

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA G

21

配列番号:170

配列の長さ:22

配列の型:核酸

筋の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GC

22

配列番号:171

配列の長さ:23

配列の型:核酸

筋の数:一本鎖

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAG

24

配列番号:173

配列の長さ:25

配列の型:核酸

筋の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGC

25

配列番号:174

配列の長さ:26

配列の型:核酸

筋の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCA

23

配列番号:172

配列の長さ:24

配列の型:核酸

筋の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCA

26

配列番号:175

配列の長さ:27

配列の型:核酸

筋の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAG

27

配列番号:176

配列の長さ:28

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGC

28

配列番号:177

配列の長さ:29

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG C

31

配列番号:180

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCA

29

配列番号:178

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG

30

配列番号:179

配列の長さ:31

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CA

32

配列番号:181

配列の長さ:33

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAG

33

配列番号:182

配列の長さ:34

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGC

34

配列番号:183

配列の長さ:35

配列の型:核酸

鎖の数:…本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGC

37

配列番号:186

配列の長さ:38

配列の型:核酸

鎖の数:…本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCA

38

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCA

35

配列番号:184

配列の長さ:36

配列の型:核酸

鎖の数:…本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAG

36

配列番号:185

配列の長さ:37

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:187

配列の長さ:39

配列の型:核酸

鎖の数:…本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG

39

配列番号:188

配列の長さ:40

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTGATGGGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC 40
 配列番号:189
 配列の長さ:41
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTGATGGGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC A 41
 配列番号:190
 配列の長さ:42

起源:
 配列
 CTGATGGGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGT 43
 配列番号:192
 配列の長さ:44
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTGATGGGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTC 44
 配列番号:193
 配列の長さ:45
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖

配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTGATGGGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAE CAGCAGCAGC AG 42
 配列番号:191
 配列の長さ:43
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列
 CTGATGGGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCA 45
 配列番号:194
 配列の長さ:46
 配列の型:核酸
 鎖の数:一本鎖
 トポロジー:不明
 配列の種類:cDNA
 ハイボセティカル配列:No
 アンチセンス:No
 フラグメント型:
 起源:
 配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG

46

配列番号:195

配列の長さ:47

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGTCACG

47

配列番号:196

配列の長さ:48

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:198

配列の長さ:50

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGTCACGCTA

50

配列番号:199

配列の長さ:51

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGTCACG

48

配列番号:197

配列の長さ:49

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGTCACGCT

49

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGTCACGCTA A

51

配列番号:200

配列の長さ:52

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG AGTCACGCTA AC

52

配列番号:201

配列の長さ:53

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACC 53

配列番号:202

配列の長さ:54

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAA 56

配列番号:205

配列の長さ:57

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCG 54

配列番号:203

配列の長さ:55

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCG 55

配列番号:204

配列の長さ:56

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAAT 57

配列番号:206

配列の長さ:58

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATC 58

配列番号:207

配列の長さ:59

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 59

配列番号:208

配列の長さ:60

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60

TG 62

配列番号:211

配列の長さ:63

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60

TGG 63

配列番号:209

配列の長さ:61

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC T 61

配列番号:210

配列の長さ:62

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列番号:212

配列の長さ:64

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60

TGGT 64

配列番号:213

配列の長さ:65

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTC 65

配列番号:214

配列の長さ:66

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCA 66

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCAGA 68

配列番号:217

配列の長さ:69

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCAGAT 69

配列番号:215

配列の長さ:67

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCAG 67

配列番号:216

配列の長さ:68

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:218

配列の長さ:70

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCAGATC 70

配列番号:219

配列の長さ:71

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCAGATC T 71

配列番号:220

配列の長さ:72

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATCCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTCACGCTA ACCGAATCCC 60
TGGTCAGATC TT 72

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCT 14

配列番号:223

配列の長さ:15

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTG 15

配列番号:224

配列の長さ:16

配列番号:221

配列の長さ:13

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCC 13

配列番号:222

配列の長さ:14

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGT 16

配列番号:225

配列の長さ:17

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

| | | | |
|-------------------------|----|---------------------------|----|
| 起源: | | トボロジー:不明 | |
| 配列 | | 配列の種類:cDNA | |
| TGCACCTGAC TCCTGTG | 17 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:226 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:18 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トボロジー:不明 | | TGCACCTGAC TCCTGTGGA | 19 |
| 配列の種類:cDNA | | 配列番号:228 | |
| ハイボセティカル配列:No | | 配列の長さ:20 | |
| アンチセンス:No | | 配列の型:核酸 | |
| フラグメント型: | | 鎖の数:一本鎖 | |
| 起源: | | トボロジー:不明 | |
| 配列 | | 配列の種類:cDNA | |
| TGCACCTGAC TCCTGTGG | 18 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:227 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:19 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| | | | |
| TGCACCTGAC TCCTGTGGAG | 20 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:229 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:21 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トボロジー:不明 | | TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AA | 22 |
| 配列の種類:cDNA | | 配列番号:231 | |
| ハイボセティカル配列:No | | 配列の長さ:23 | |
| アンチセンス:No | | 配列の型:核酸 | |
| フラグメント型: | | 鎖の数:一本鎖 | |
| 起源: | | トボロジー:不明 | |
| 配列 | | 配列の種類:cDNA | |
| TGCACCTGAC TCCTGTGGAG A | 21 | ハイボセティカル配列:No | |
| 配列番号:230 | | アンチセンス:No | |
| 配列の長さ:22 | | フラグメント型: | |
| 配列の型:核酸 | | 起源: | |
| 鎖の数:一本鎖 | | 配列 | |
| トボロジー:不明 | | TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAG | 23 |
| 配列の種類:cDNA | | | |

配列番号:232

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGT

24

配列番号:233

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTG

27

配列番号:236

配列の長さ:28

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTC

25

配列番号:234

配列の長さ:26

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCT

26

配列番号:235

配列の長さ:27

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGC

28

配列番号:237

配列の長さ:29

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCC

29

配列番号:238

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG

30

配列番号:239

配列の長さ:31

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA

33

配列番号:242

配列の長さ:34

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTAC

34

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG

31

配列番号:240

配列の長さ:32

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TT

32

配列番号:241

配列の長さ:33

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:243

配列の長さ:35

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA

35

配列番号:244

配列の長さ:36

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTACTG

36

配列番号:245

配列の長さ:37

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTACTGC

37

配列番号:246

配列の長さ:38

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTACTGCC

39

配列番号:248

配列の長さ:40

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTACTGCCCT

40

配列番号:249

配列の長さ:41

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTACTGCC

38

配列番号:247

配列の長さ:39

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTACTGCCCT G

41

配列番号:250

配列の長さ:42

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC

42

配列番号:251

配列の長さ:43

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC GTG

43

配列番号:252

配列の長さ:44

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:254

配列の長さ:46

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC GTGGGG

46

配列番号:255

配列の長さ:47

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC GTGG

44

配列番号:253

配列の長さ:45

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC GTGGG

45

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC GTGGGGC

47

配列番号:256

配列の長さ:48

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGCCC GTGGGGCA

48

配列番号:257

配列の長さ:49

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGDCCT GTGGGGCAA

49

配列番号:258

配列の長さ:50

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGDCCT GTGGGGCAAG GT

52

配列番号:261

配列の長さ:209

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGDCCT GTGGGGCAAG

50

配列番号:259

配列の長さ:51

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGCACCTGAC TCCTGTGGAG AAGTCTGCCG TTA CTGDCCT GTGGGGCAAG G

51

配列番号:260

配列の長さ:52

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

CATTTCCTTC TGACACAACCT GTGTTCACTA GCAACCTCAA ACAGACACCA TGGTGCACCT 60
 GACTCCTCTG GAGAACTCTG CCGTTACTGC CCTGTGGGGC AAGGTGAACG TGGATGAAGT 120
 TGGTGGTGAG GCCCTGGGCA GGTGGGTATC AAGGTTACAA GACAGGTTTA AGGAGACCAA 180
 TAGAAACTGG GCATGTGGAG ACAGAGAAG 209

配列番号:262

配列の長さ:88

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TGAGACTCTG TCTCAAAAAT AAATAAATAA ATAAATAAAT AAATAAATAA ATAAATAAAT 60
 AAATAAATAA GTAAAAAAGA AAGAATGC 88

配列番号:263

配列の長さ:54

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTGTGTGTGT GTGTGTGT TTTTITTAAC AGGGATTGG GGAATTATT GAGA

54

配列番号:264

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTCCCCAAAT CCTGTATAA AAAAAAC

27

配列番号:267

配列の長さ:103

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTAAAAAGAC CGCCAGTGC AAGCTTGCA TGCCTGACGT CGACTCTAGA GGATCCCGG

60

GTACCCGAGCT CGAAATCGTA ATCATGCTCA TAGCTTTTC CTG

103

配列

TTCCCCAAAT CCTGTATAA AAC

23

配列番号:265

配列の長さ:26

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TTCCCCAAAT CCTGTATAA AAAAC

25

配列番号:266

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列番号:268

配列の長さ:78

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GAGTCAGGTG CGCCATGCCT CAAACAGACA CCATGTTGCA CCTGACTCCT GAGGAGNCTG

60

GGCATGTGGA GACAGAGA

78

配列番号:269

配列の長さ:78

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCTCTGTC CACATGCCCA GNCCTCTCAG GACTCAGGTG CACATGGTGT CTGTTTGAGG 60
CATGGCGCAC CTGAGCTC 78

配列番号:270

配列の長さ:78

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCTCTGTC CACATGCCCA GNCCTCTCAG GAGTCAGGTG CGCCATGGTG TCTGTTTGAG 60
GCATGGCGCA CTGACTC 76

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCTCTGTC CACATGCCCA GNCCTCTCAG GAGTCAGGTG CG 42

配列番号:273

配列の長さ:13

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CACCTGACTC CTA 13

配列番号:271

配列の長さ:82

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCTCTGTC CACATGCCCA GNCCTCTCAG GAGTCAGGTG CGCCATGGTG TCTGTTTGAG 60
GCATGGCGCA CCTGACTCCT GA 82

配列番号:272

配列の長さ:42

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

配列番号:274

配列の長さ:14

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CACCTGACTC CTGGA 14

配列番号:275

配列の長さ:14

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CACTGACTC CTGA

14

配列番号:276

配列の長さ:26

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CCATGGTGTG TGTITGAGGC ATGGGC

26

配列番号:277

配列の長さ:75

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CAGCTCTCAT TTTCATACA GTCAGTATCA ATTCTGGAAG AATTTCCAGA CATTAAAGAT

60

AGTCATCTTG GGGCT

75

配列番号:278

配列の長さ:61

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACCTAGCGTT CAGTTCGACT GAGATAATAC GACTCACTAT AGCAGCTCTC ATTTTCATA

60

C

61

配列番号:279

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GUCACACACG GUGAGGUCCA

20

配列番号:280

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTCAGTCCAC GTGGTACCCT GCTG

24

配列番号:281

配列の長さ:85

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CATTTCCTTC TGACACAAC TGTTCAC TAACCTCAA ACAGACACCA TGTGCACT 60
GACTCTGAG GAGAAGTCTG CCCTT 85

配列番号:282

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACGGGTCCCG GAGTGTCTC GC 22

配列番号:283

配列の長さ:76

配列の型:核酸

起源:

配列

ACTGCCCTGT GGGCAAGGT GAACGTGGAT GAAGTTGTTG GTGAGGCCCT GGGCAGATTG 60
GTATCAAGGT TACAAG 76

配列番号:285

配列の長さ:76

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACTGCCCTGT GGGCAAGGT GAACGTGGAT GAAGTTGTTG GTGAGGCCCT GGGCAGATTG 60
GTATCAAGGT TACAAG 76

配列番号:286

配列の長さ:76

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACTGCCCTGT GGGCAAGGT GAACGTGGAT GAAGTTGTTG GTGAGGCCCT GGGCAGATTG 60
GTATCAAGGT TACAAG 76

配列番号:284

配列の長さ:76

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACTGCCCTGT GGGCAAGGT GAACGTGGAT GAAGTTGTTG GTGAGGCCCT GGGCAGATTG 60
GTATCAAGGT TACAAG 76

配列番号:287

配列の長さ:48

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACAGGTTTAA GGAGACCAAT AGAACTGGG CATGTGAGA CAGAGAAG

48

配列番号:288

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GACGACGACT GCTACCTGAC TCCA

24

配列番号:289

配列の長さ:24

配列の型:核酸

配列

TGGAGTCAGG TAGCAGTC

18

配列番号:291

配列の長さ:60

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CAGGCTCTCAT TTTCATACA GTCAGTATCA ATTGTGGAAG AATTTCGAGA CATTAAAGAT

60

配列番号:292

配列の長さ:65

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ACAGCGCACT GCTACCTGAC TCCA

24

配列番号:290

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

AGTCATCTTG GGGCTGTCCA GAGTAAAGG TATGTCAGTC ATAGTTAAGA CCTTCTTAAA
GGTCT

60

65

配列番号:293

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GTAATTCTTA TCAGTAGAAC CCGGA

25

ハイボセティカル配列:No

配列番号:294

アンチセンス:No

配列の長さ:60

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

AGTCATCTTG GGGCT

15

配列の種類:cDNA

配列番号:296

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:60

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

CAGCTCTCAT TTTCATACA GTCAGTATCA ATTCTGGAAG AATTTCGAGA CATTAAAGAT 60

ハイボセティカル配列:No

配列番号:295

アンチセンス:No

配列の長さ:15

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CAGCTCTCAT TTTCATACA GTCAGTATCA ATTCTGGAAG AATTTCGAGA CATTAAAGAT 60

配列の種類:cDNA

配列番号:297

アンチセンス:No

配列の長さ:16

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CAGCTCTCAT TTTCATACA TTAAGATAG TCATCTTGGG GCT 43

配列の種類:cDNA

配列番号:299

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:44

アンチセンス:No

配列の型:核酸

フラグメント型:

鎖の数:一本鎖

起源:

トポロジー:不明

配列

配列の種類:cDNA

AGTCATCTTG GGGCTA 16

ハイボセティカル配列:No

配列番号:298

アンチセンス:No

配列の長さ:43

フラグメント型:

配列の型:核酸

起源:

鎖の数:一本鎖

配列

トポロジー:不明

CAGCTCTCAT TTTCATACA TTAAGATAG TCATCTTGGG GCTA 44

配列の種類:cDNA

配列番号:300

ハイボセティカル配列:No

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CAGCTCTCAT TTTCATACA GT

22

配列番号:301

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCCTGGTACA CTGCCAGGCA CTTCTCAGG TCATCGGCAT CGCGGAGGAG

50

配列番号:304

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

起源:

配列

CAGCTCTCAT TTTCATACA T

21

配列番号:302

配列の長さ:50

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GCCTGGTACA CTGCCAGGCG CTTCTCAGG TCATCGGCAT CGCGGAGGAG

50

配列番号:303

配列の長さ:50

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

GATGCCGATG ACCTGCAGAA G

21

配列番号:305

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGCCGATG ACCTGCAGAA GC

22

配列番号:306

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGCCGATG ACCTGCAGAA GTGC

24

配列番号:307

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CG

12

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CG

12

配列番号:310

配列の長さ:35

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

GGCGGGGACA TGGAGGACCT GTCCGGCCGC CTGCT

35

配列番号:311

配列の長さ:34

配列番号:308

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATGCGTC GGATCATC

18

配列番号:309

配列の長さ:12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

TCCGCGATGC CGATGACCTG CAGAGCCGC TGGC

34

配列番号:312

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGGCTGCGAT CACCGTGGG CACAGCT

27

配列番号:313

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGGCTGCGAT CACCGTGGG T

21

配列番号:314

配列の長さ:27

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGGCTGCGAT CACCGTGGG AACAGCT

27

配列番号:315

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGGCTGCGAT CACCGTGGG CA

22

配列番号:316

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGGCTGCGAT CACCGTGGG TA

22

配列番号:317

配列の長さ:21

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

CGGCTGCGAT CACCGTGGG A

21

配列番号:318

配列の長さ:42

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ATCATCAACT GGAAGATCAG GTCAGGAGCC ACTTGCCANC CT

42

配列番号:319

配列の長さ:33

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ATCATCAC TGGGAAGACTC CAGGTCAGGA GCC

33

アンチセンス:No

フラグメント型:

起源:

配列

ATCCACTACA ACTACATGTC TAACAGTTGG WGCANGCC

48

配列番号:320

配列の長さ:48

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:不明

配列の種類:cDNA

ハイボセティカル配列:No

【図1】

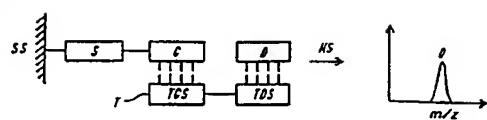


FIG. 1A

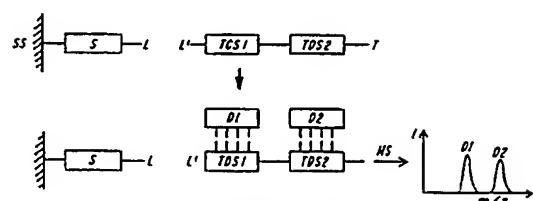


FIG. 1B

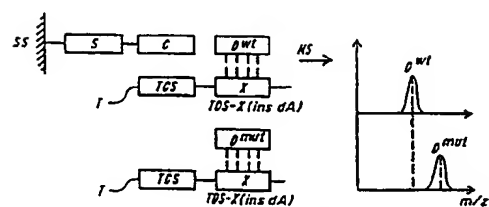


FIG. 1C

【図2】

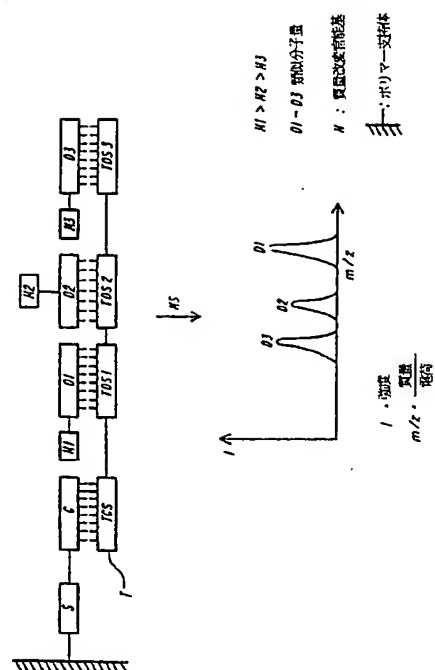


FIG. 2

【図3】

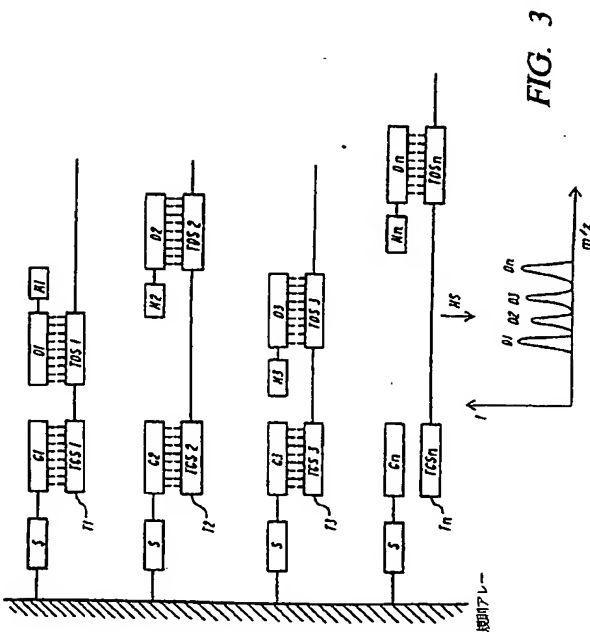


FIG. 3

【図4】

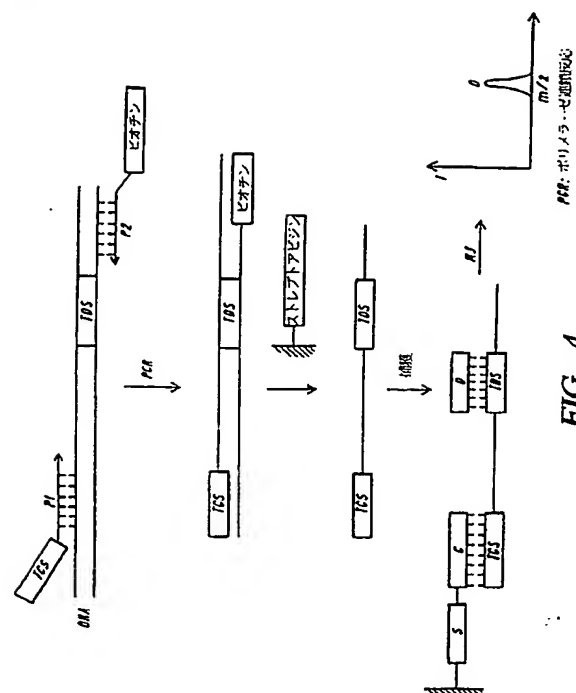


FIG. 4

【図5】

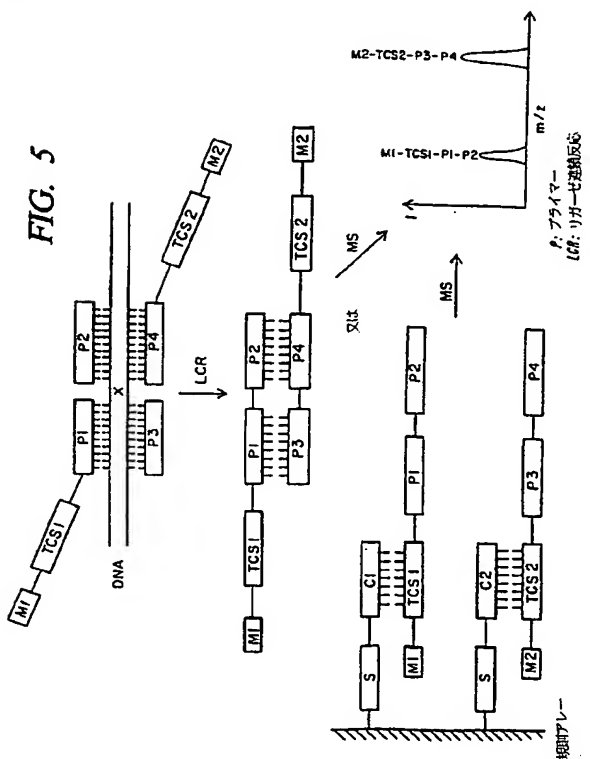


FIG. 5

【図6】

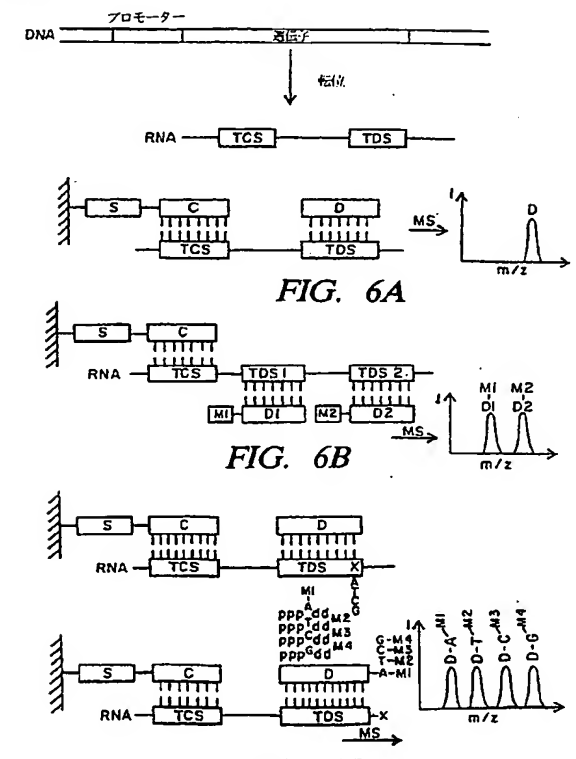
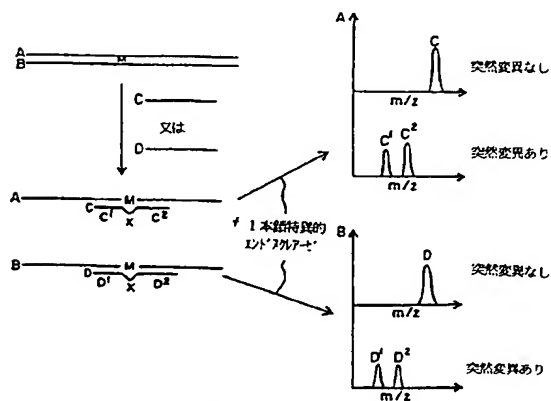
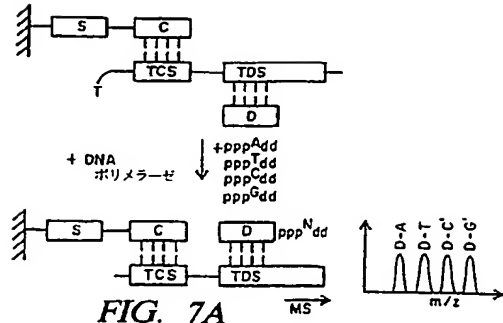


FIG. 6A

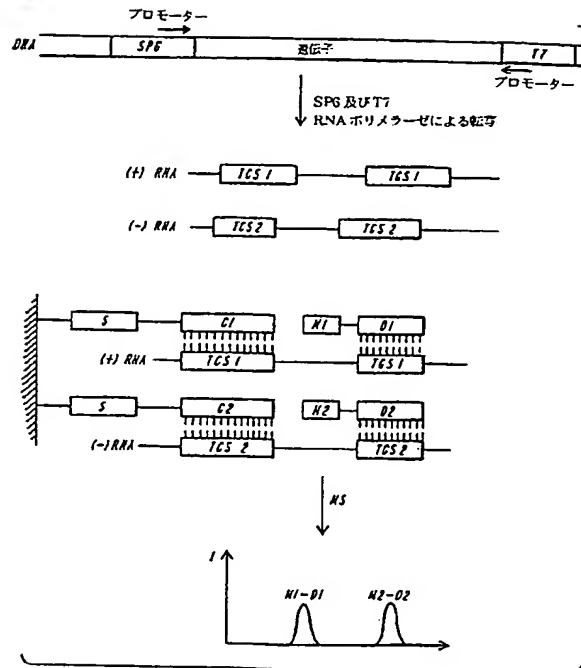
FIG. 6B

FIG. 6C

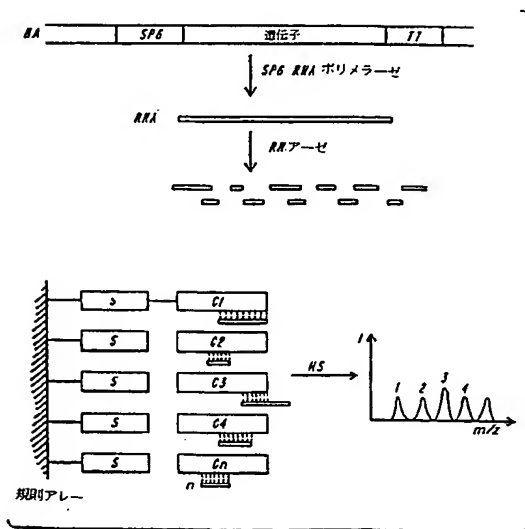
【図7】



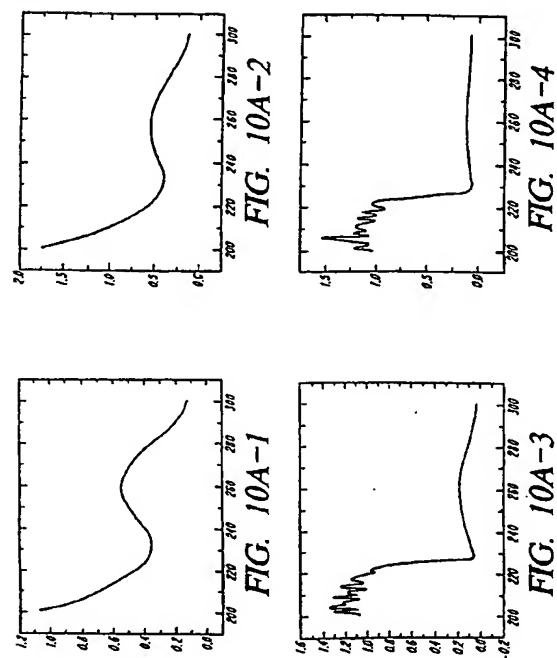
【図8】



【図9】



【図10】



【图 10】

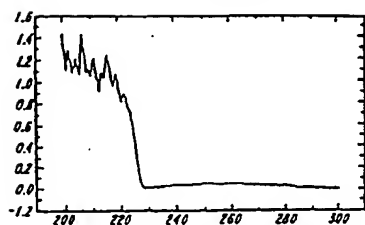


FIG. 10B

【图 12】

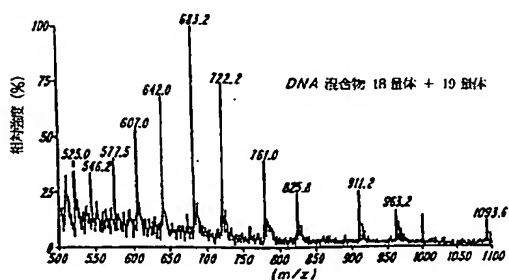


FIG. 12A

【图 10】

特表 2002-507883

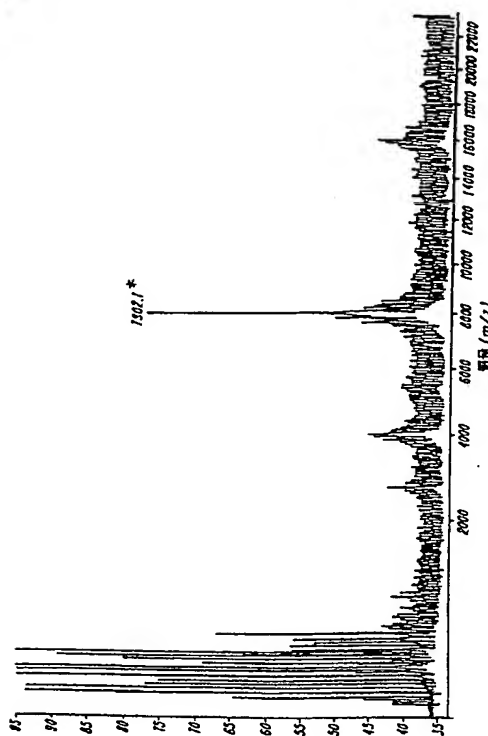


FIG. 10C

【图 11】

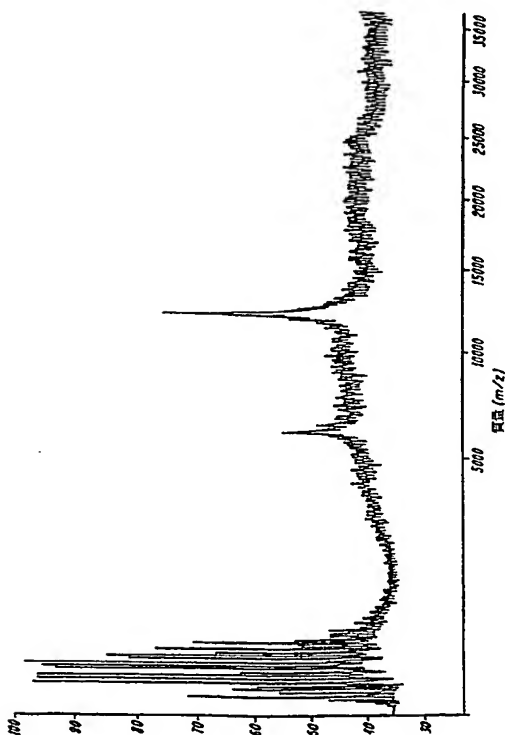


FIG. 11

【图 12】

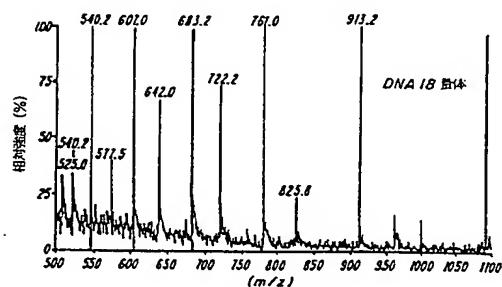


FIG. 12B

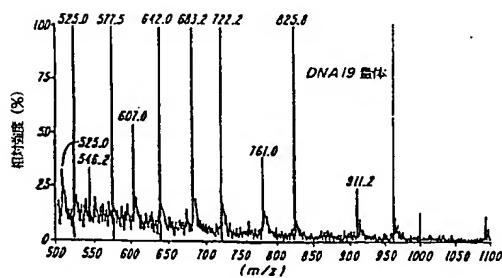


FIG. 12C

【図13】

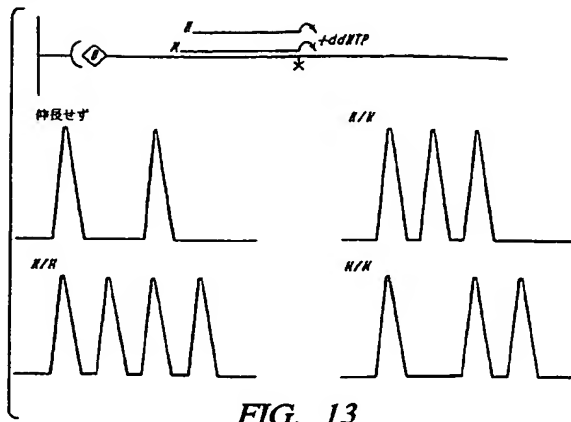


FIG. 13

【図19】

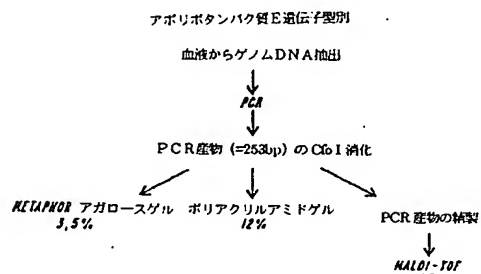


FIG. 19

【図14】

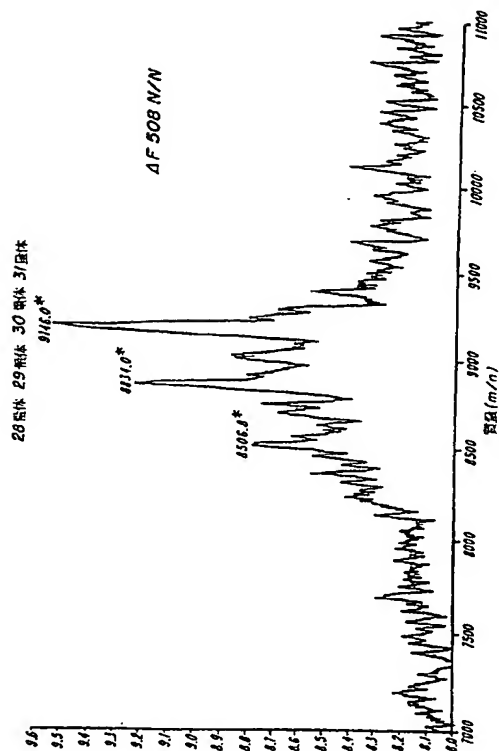


FIG. 14

【図15】

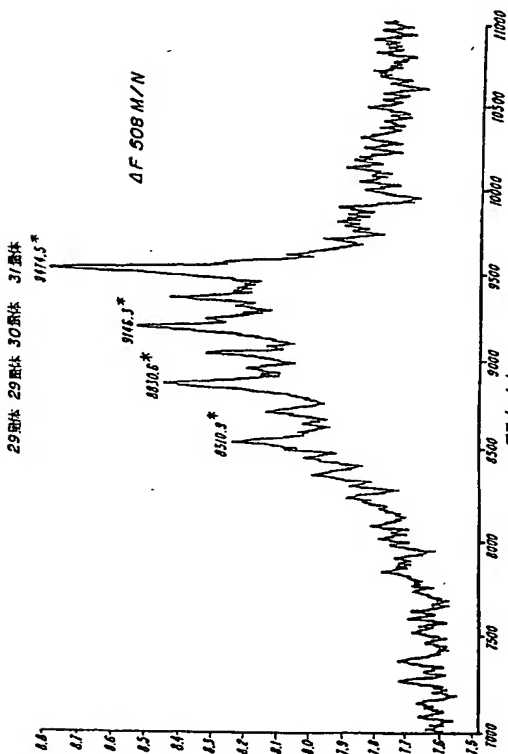


FIG. 15

【図16】

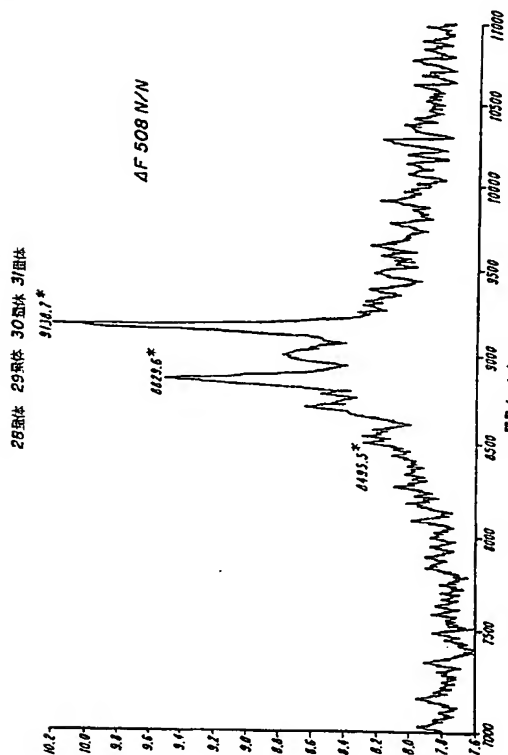


FIG. 16

【図17】

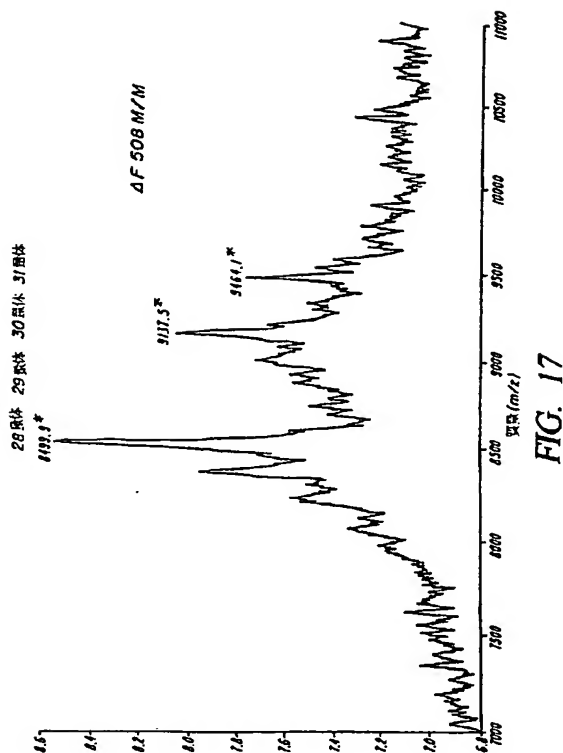


FIG. 17

【図18】

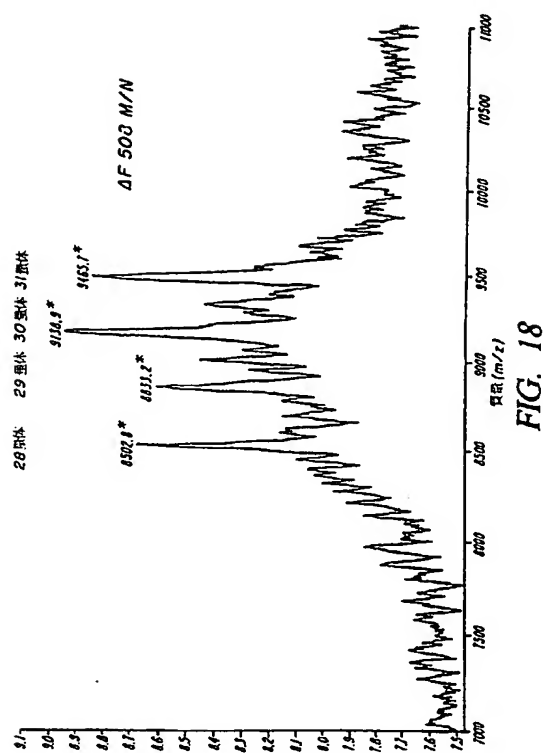


FIG. 18

【図20】

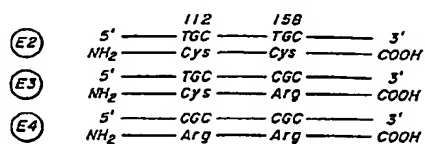


FIG. 20A

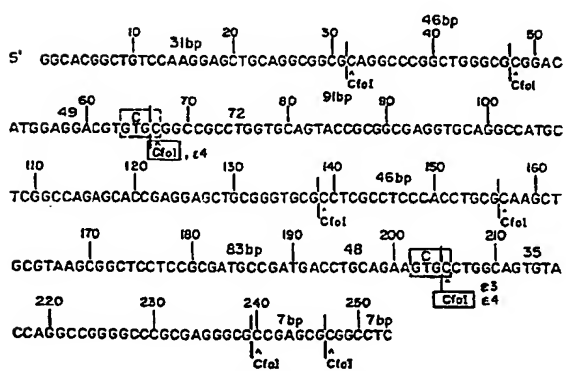


FIG. 20B

【図21】

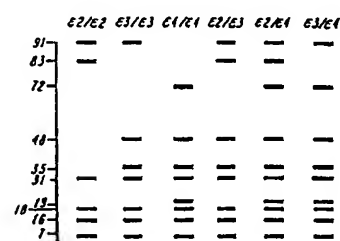


FIG. 21A

【図21】

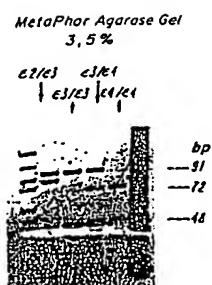


FIG. 21B

ポリアクリルアミドゲル 12%

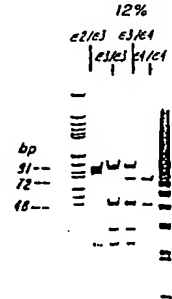


FIG. 21C

【図22】

| 可変フラグメントの分子量 (Da) | | | e2/e2 | e3/e3 | e4/e4 | e2/e3 | e2/e4 | e3/e4 |
|-------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 91bp | センス | 28421 | X | X | | X | X | X |
| | アンチセンス | 27864 | | | | | | |
| 83bp | センス | 25747 | X | | | X | X | |
| | アンチセンス | 25591 | | | | | | |
| 72bp | センス | 22440 | | | X | | X | X |
| | アンチセンス | 21494 | | | | | | |
| 48bp | センス | 14844 | | X | X | X | X | X |
| | アンチセンス | 14857 | | | | | | |
| 35bp | センス | 10921 | | X | X | X | X | X |
| | アンチセンス | 10751 | | | | | | |

FIG. 22A

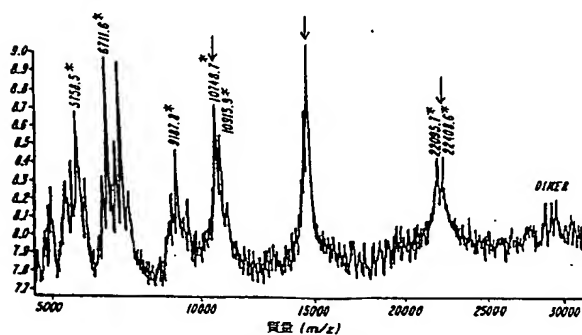


FIG. 22B

【図23】

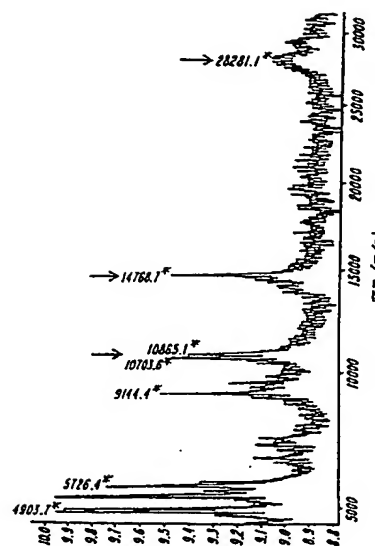


FIG. 23A

【図23】

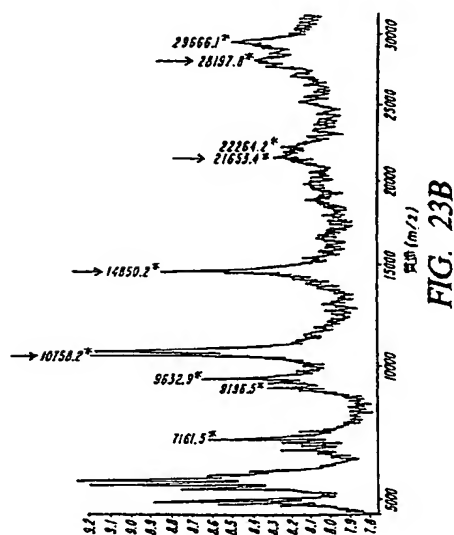


FIG. 23B

【図24】

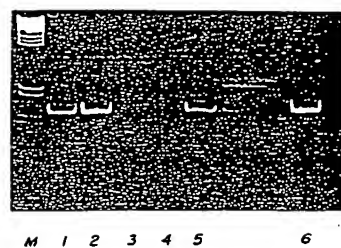


FIG. 24

【図25】

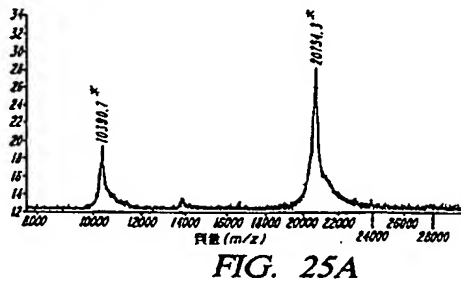


FIG. 25A

【図25】

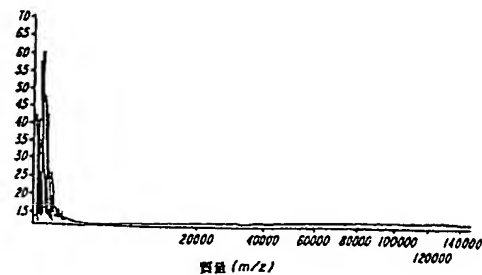


FIG. 25C

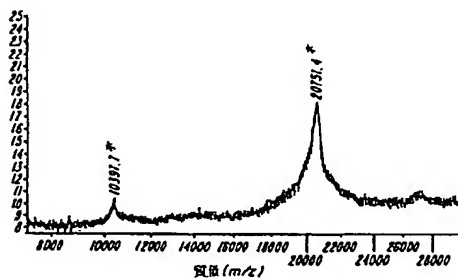


FIG. 25B

【図26】

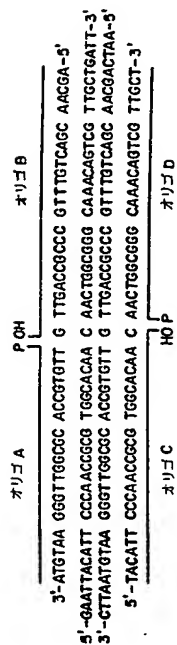


FIG. 26

【図27】

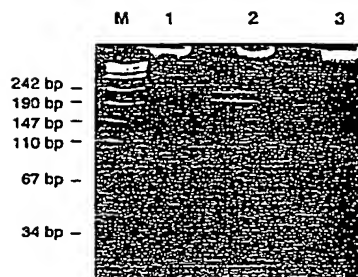


FIG. 27

【図 28】

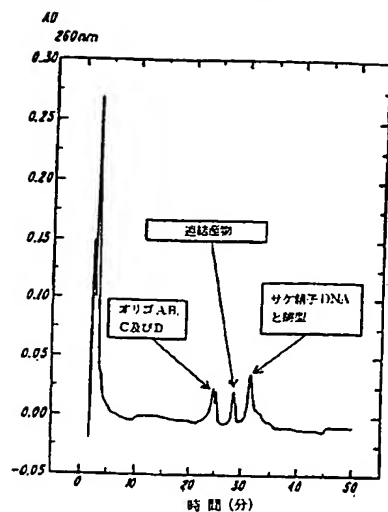


FIG. 28

【図 29】

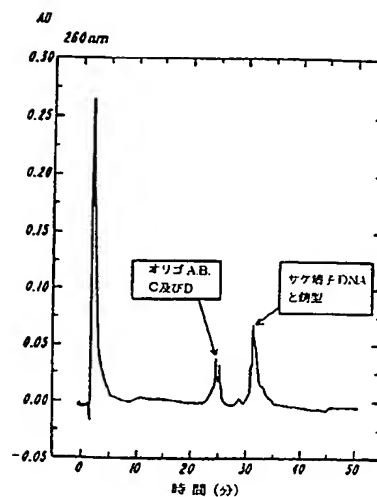


FIG. 29

【図 30】

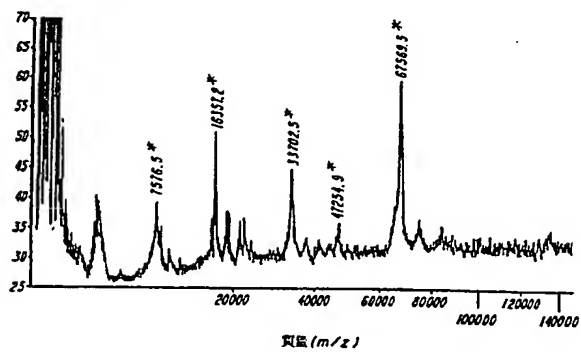


FIG. 30A

【図 31】

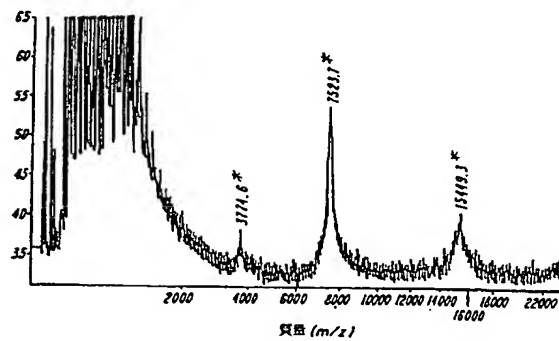


FIG. 31A

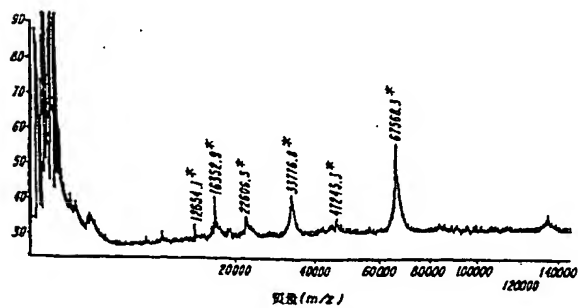


FIG. 30B

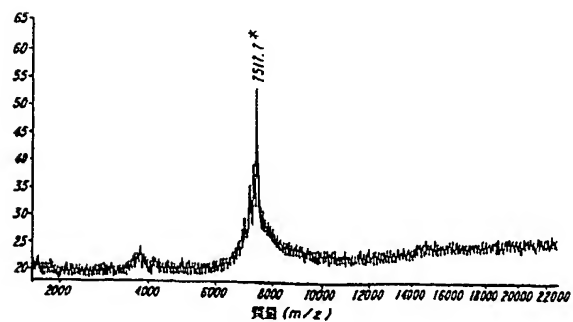


FIG. 31B

【図32】

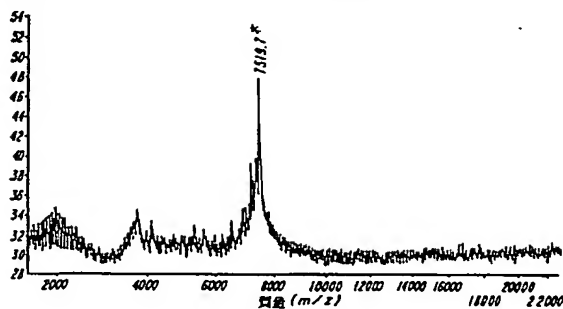


FIG. 32

【図33】

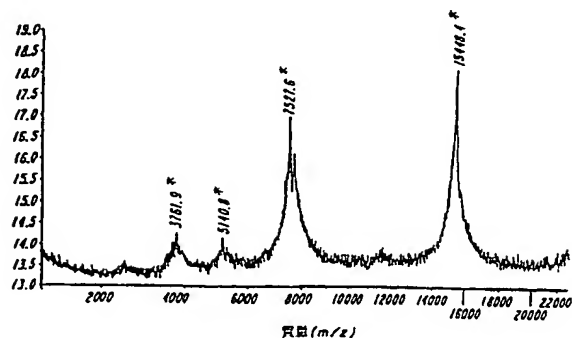


FIG. 33A

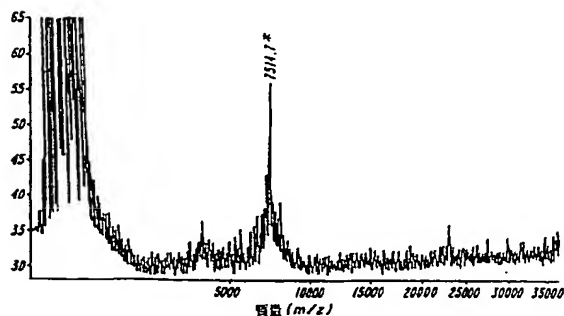


FIG. 33B

【図34】

506507508
IIeIIlephe
ACCATTAAAGAAATATCATCTTTGGGTGTTTCCTATGATGAATATAGAGCGTCATC
プライマー
TAGAAGACCAAGGATAGTACTTATATC (7289,8)
野生型
ΔF508
Δ1507
TAG---AAACACCAAGGATAGTACTTATATC (8846,8)

FIG. 34A

506507508
IIeIIlephe
ACCATTAAAGAAATATCATCTTTGGGTGTTTCCTATGATGAATATAGAGCGTCATC
プライマー
CTTTTATAGTAGAACCACAAAGGATAGTACTTATATC (7289,8)
野生型
ΔF508
Δ1507
CTTTTATAG---AAACACCAAGGATAGTACTTATATC (10857,0)
506Ser
CCTAGAAACACCAAGGATAGTACTTATATC (9465,2)

FIG. 34B

【図35】

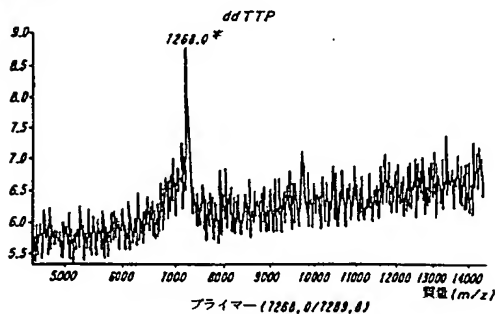


FIG. 35A

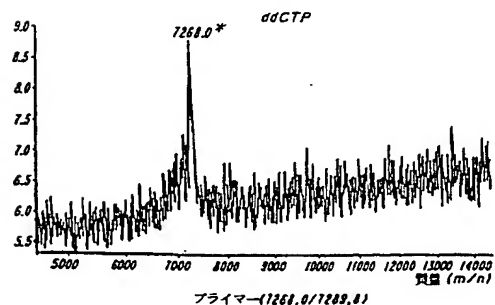


FIG. 35B

【図35】

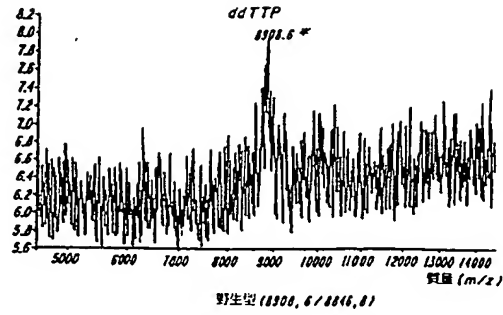


FIG. 35C

【図35】

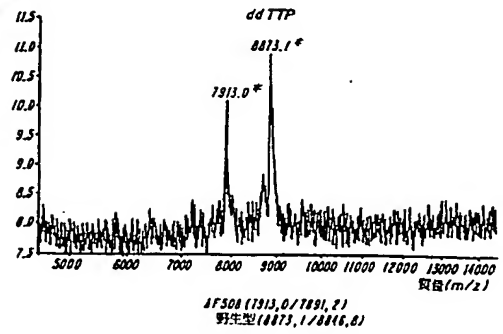


FIG. 35E

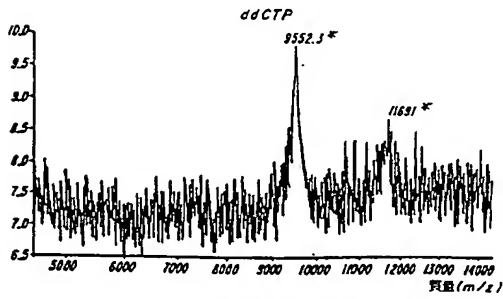


FIG. 35D

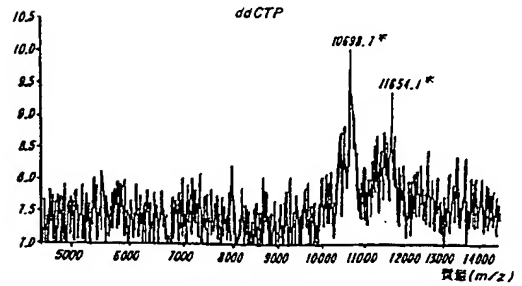


FIG. 35F

【図35】

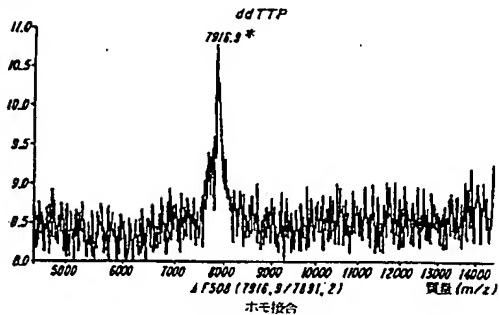


FIG. 35G

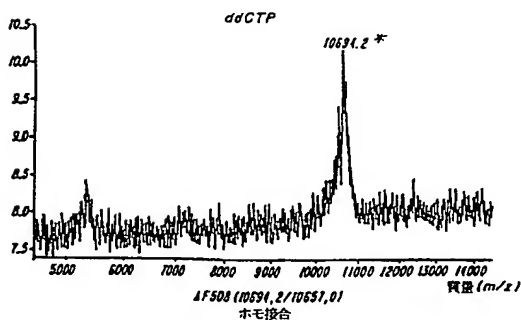


FIG. 35H

【図36】

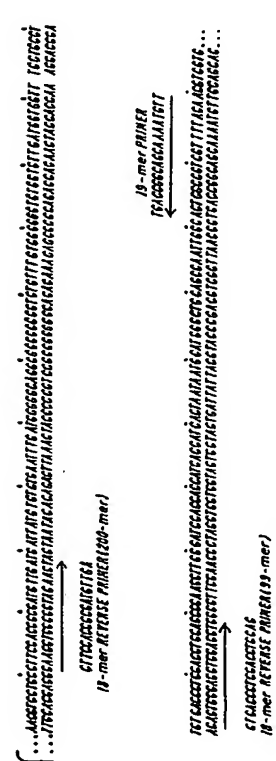


FIG. 36

【图 41】

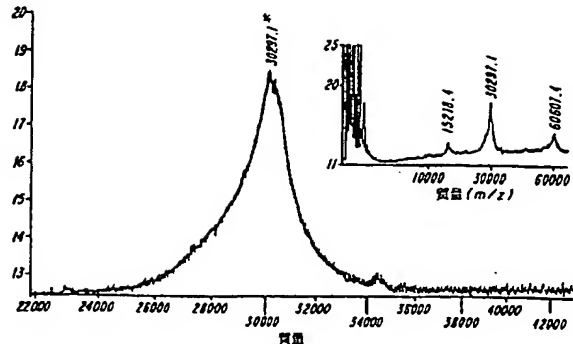


FIG. 41A

【图 42】

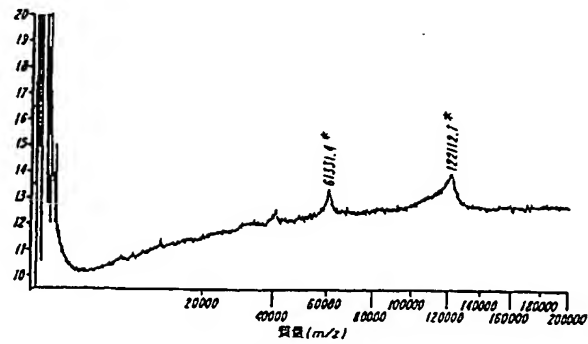


FIG. 42A

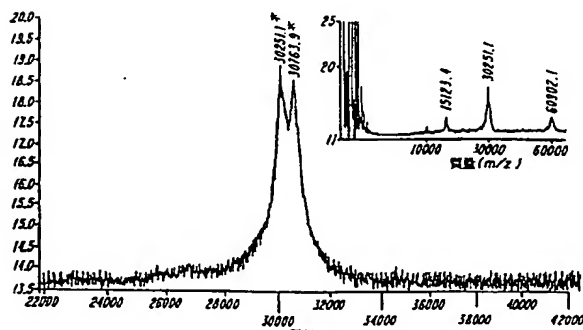


FIG. 41B

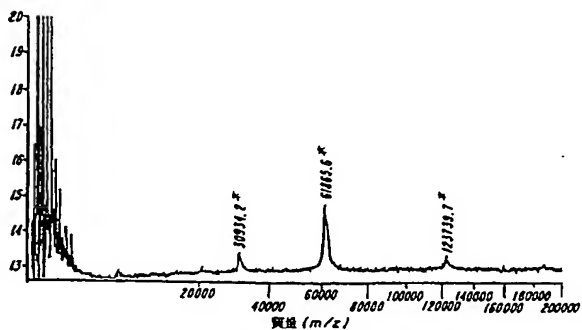


FIG. 42B

【图 43】

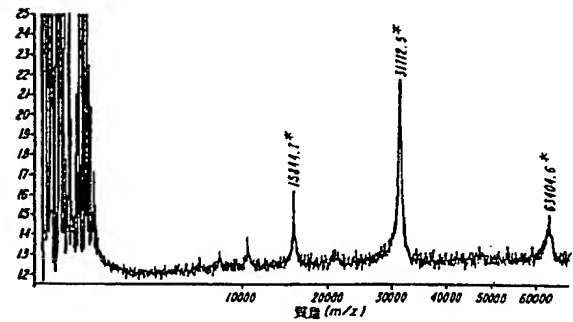


FIG. 43A

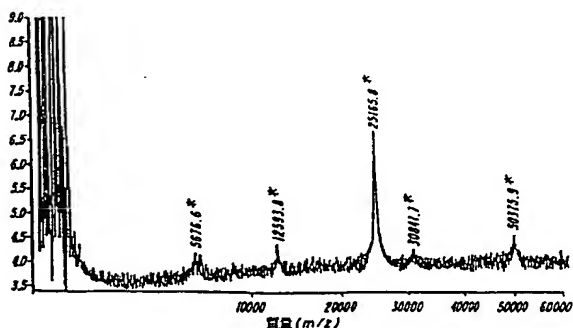


FIG. 43B

【图 44】

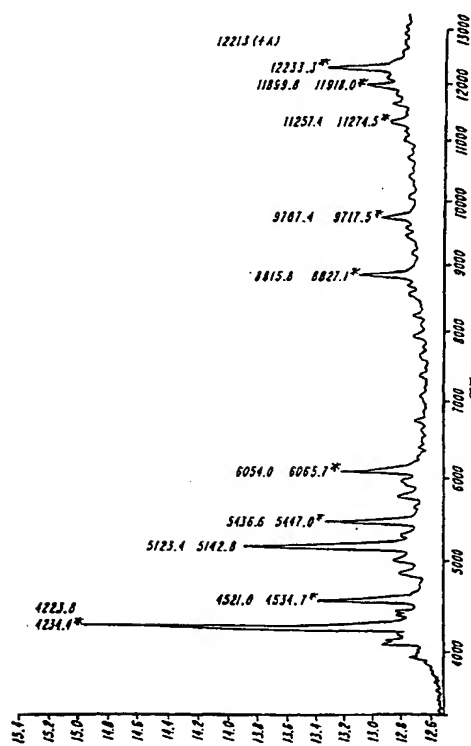
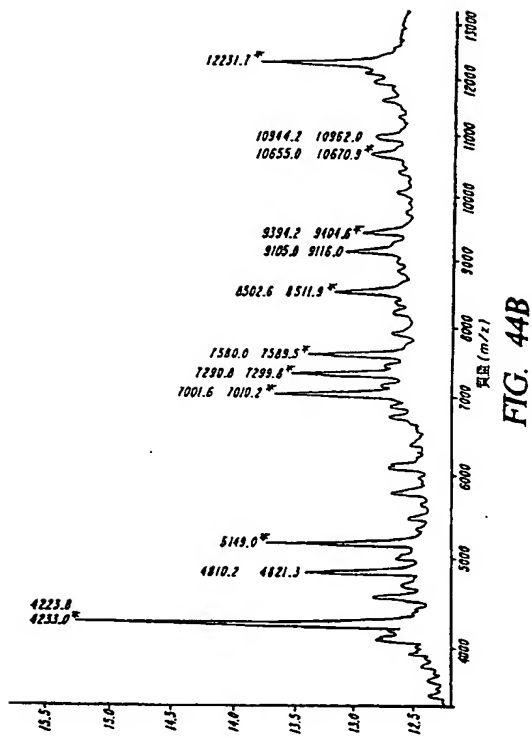
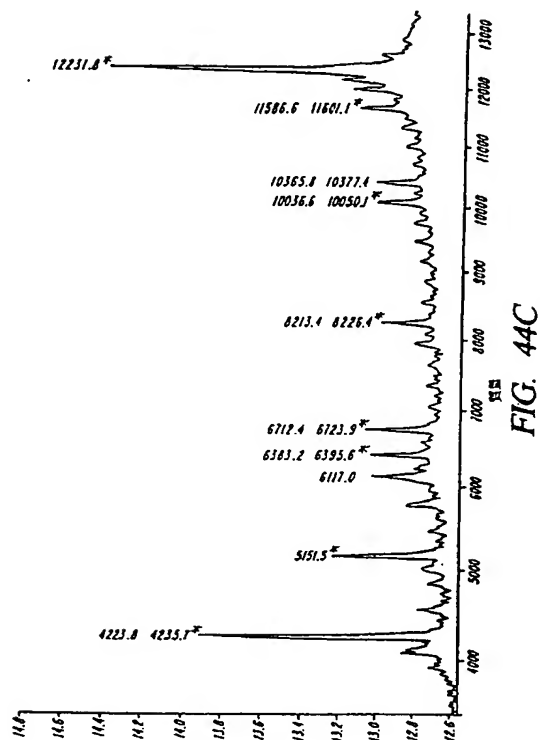


FIG. 44A

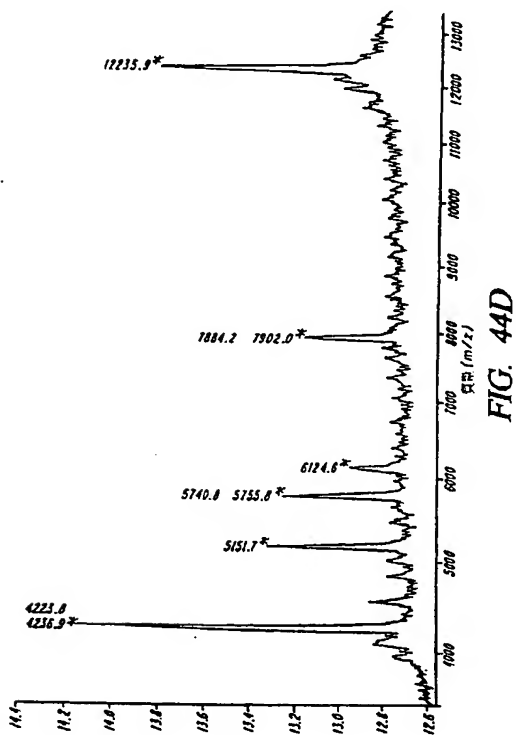
【图 4 4】



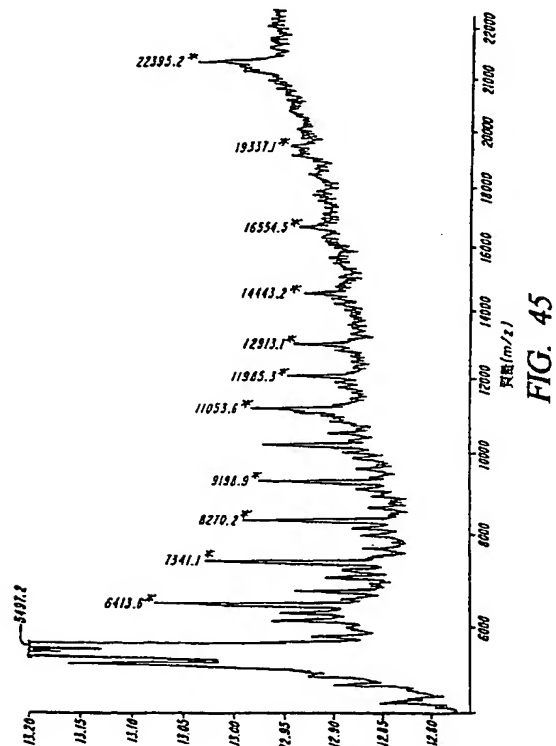
【图 4 4】



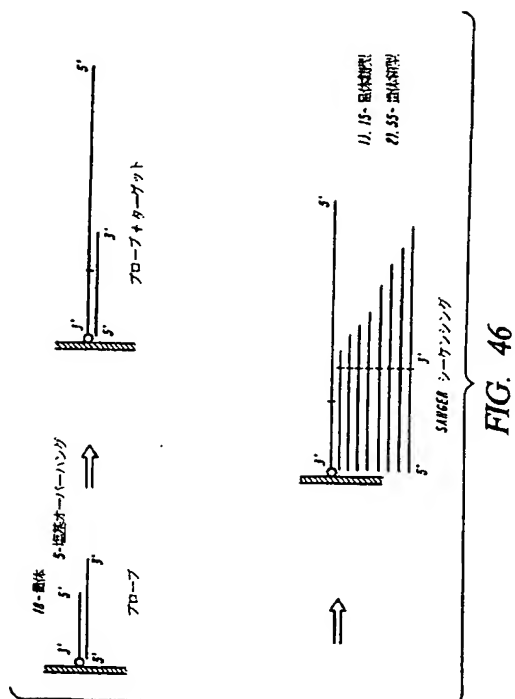
【图 4 4】



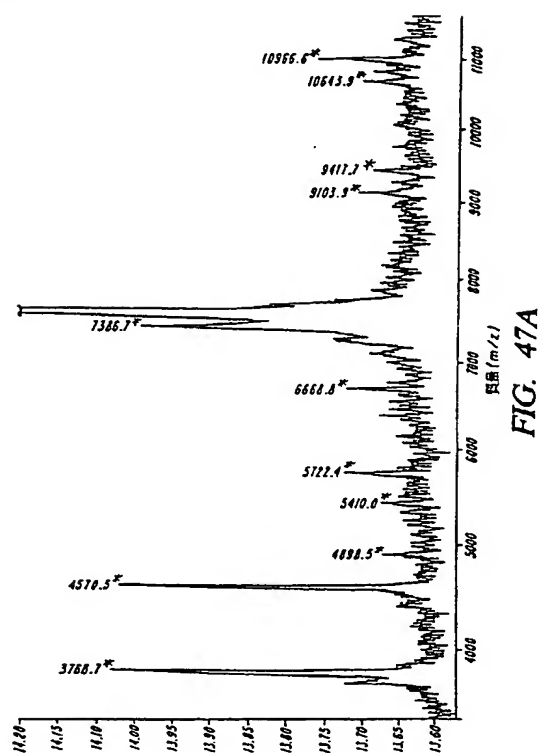
【图 4 5】



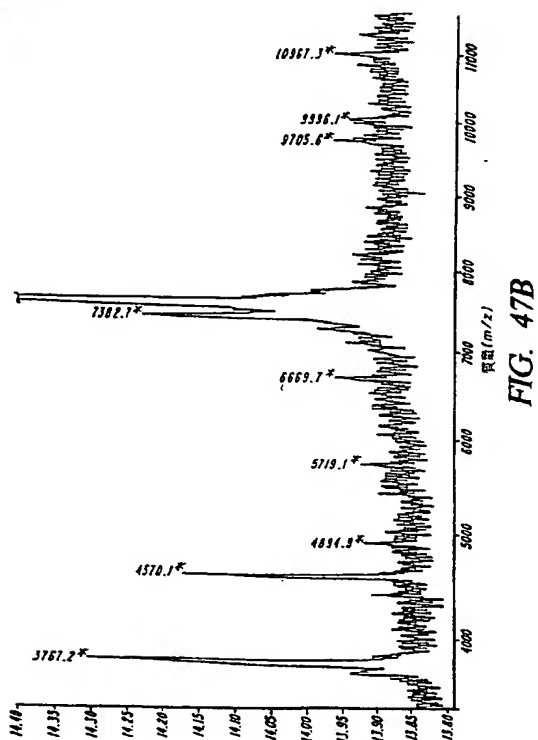
【図46】



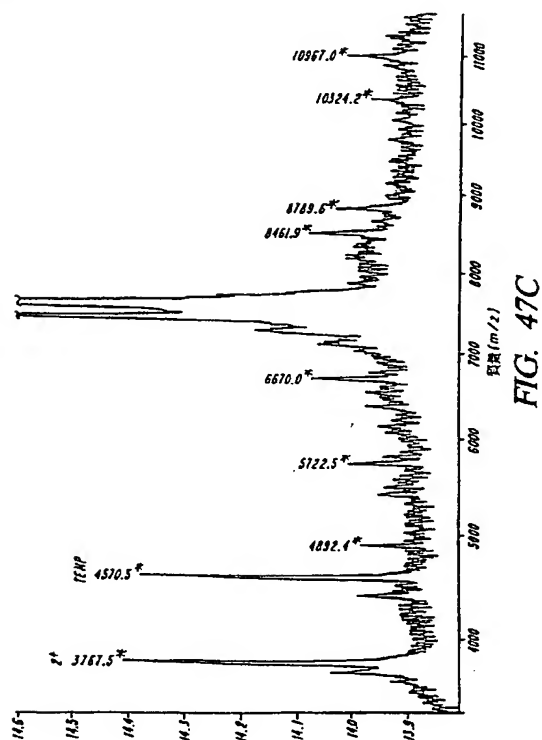
【図47】



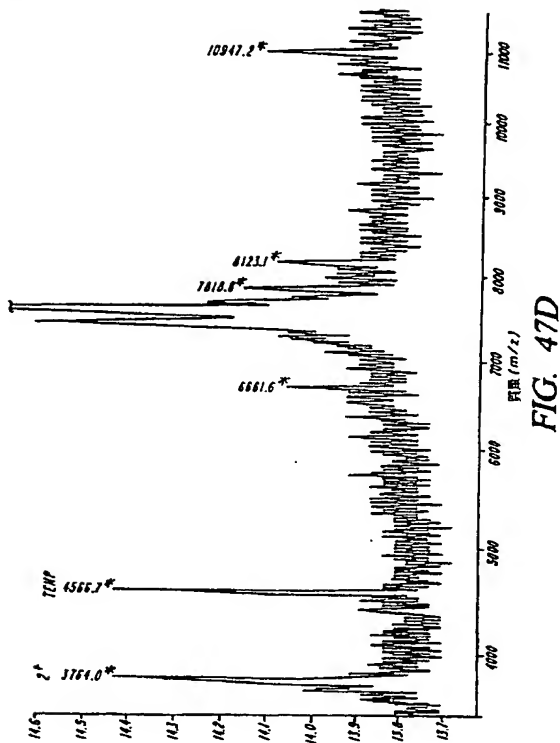
【図47】



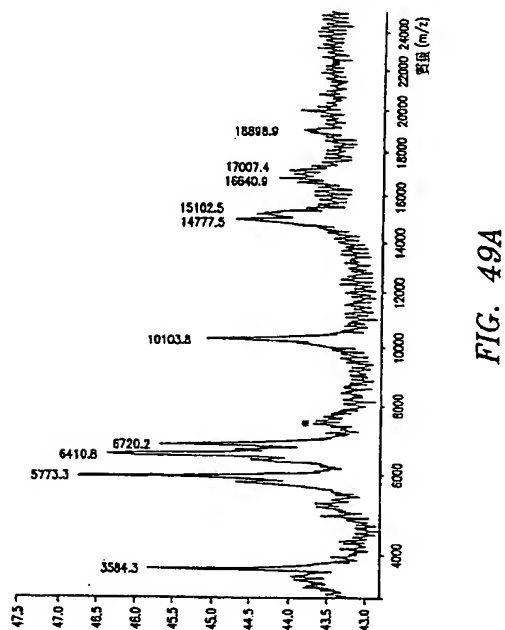
【図47】



【図 4 7】

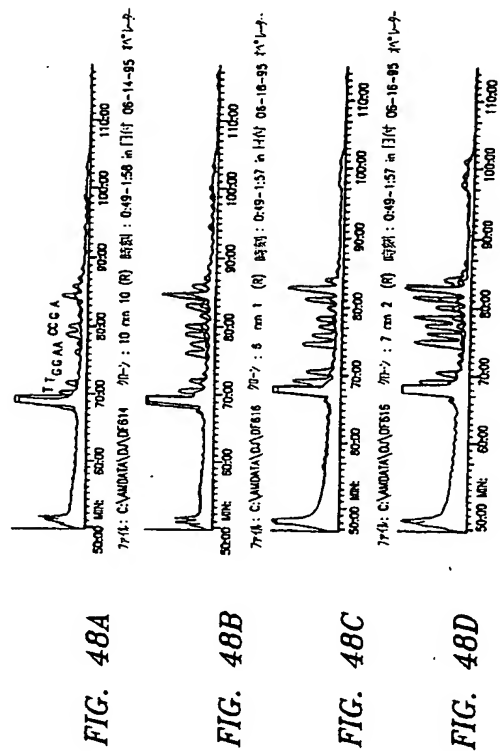


【図 4 9】

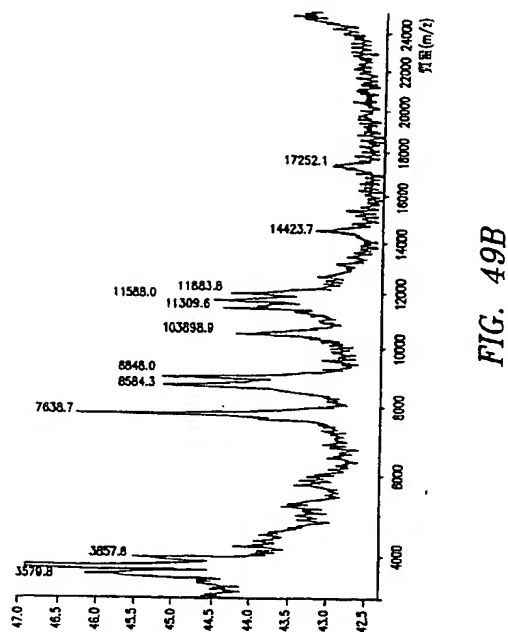


【図 4 8】

特表 2002-507883



【図 4 9】



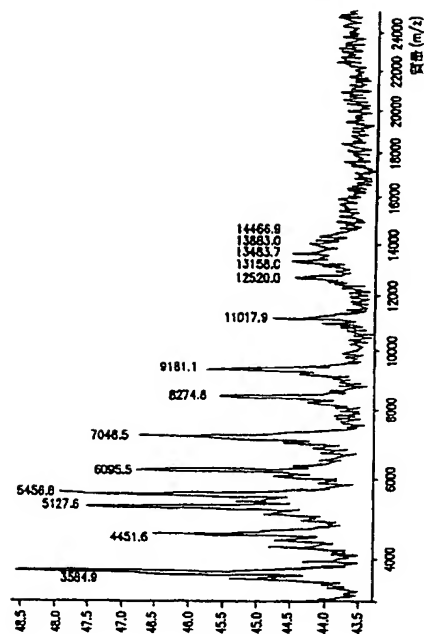


FIG. 49C

【圖 49】

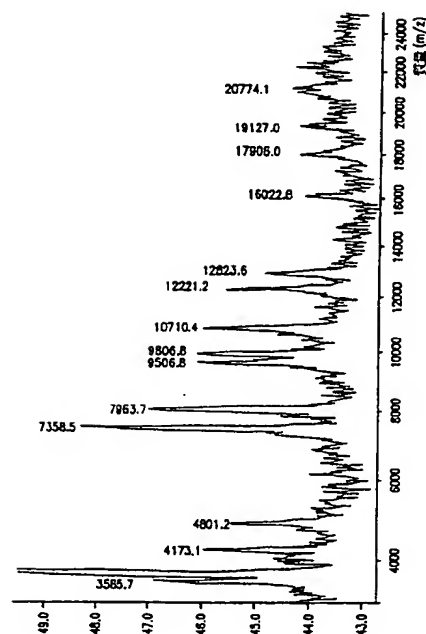


FIG. 49D

【图 5-0】

[illegible]

FIG. 50A

【☒ 5 0】

| ddATP | ddCTP | ddGTP | ddTTP |
|--------------------------|--|--|--|
| 3581.4 da | 3581.4 da 3854.6 da | 3581.4 da 4488.0 da 5120.4 da 5448.6 da 6089.0 da | 3581.4 da 4158.9 da 4781.2 da |
| 5760.8 da | | 7041.6 da | 7344.8 da |
| 6401.2 da 6713.4 da | 7634.0 da 8555.6 da 8844.8 da | 8267.4 da 9174.0 da | 7938.2 da 8477.2 da 8781.4 da |
| 10094.6 da | 10382.8 da 11304.4 da 11593.6 da 11652.8 da | 11016.2 da 12516.2 da | 10687.0 da 12187.0 da 12819.4 da |
| 14734.6 da 15146.8 da | 14421.4 da | 13148.6 da 13476.8 da 13805.0 da 14133.2 da 14734.6 da 15146.8 da | 15006.4 da |

FIG. 50B

【圖 5 1】

β-グロビン遺伝子の増幅 200bp PCR 産物の解析

FORWARD PRIMER: $\beta 2$
 CATTTCCTTC TGACAACT GTTGTACTA GCACTCTAA ACAGACACCA
 12 塩基プライマー
 TGTGCTGCA 5' GATCTCTGTG GAGAAGCTGT GCGTACTCTG CGTGTGGGG
 AAGTGACG TGTGTAAGT TGTGTGTGAG GCGCTGGCCA GGTGTGATC
 AAGTTTACA CACAGTTTA AGGAGACCA TAGAACTGG CGATGTGGAG
 ACAGAGAG
 逆プライマー: $\beta 11$

FIG. 51

【圖 5 2】

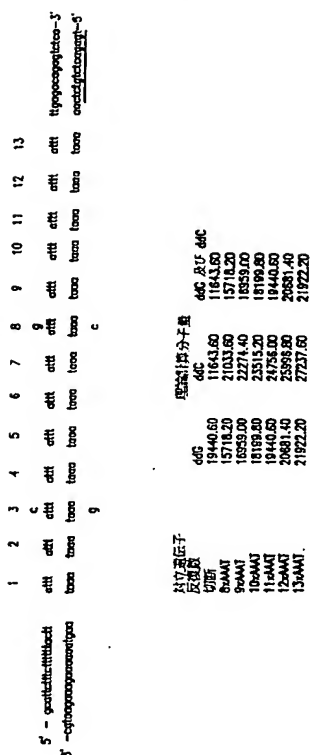
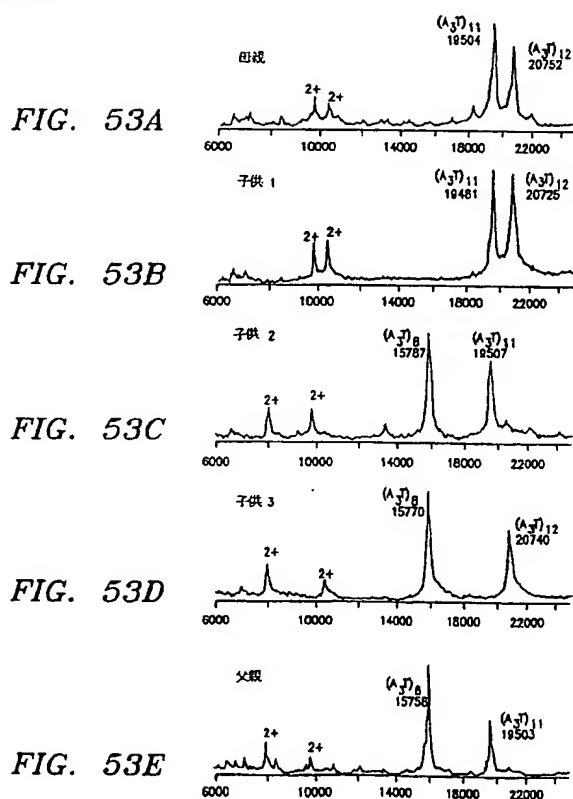
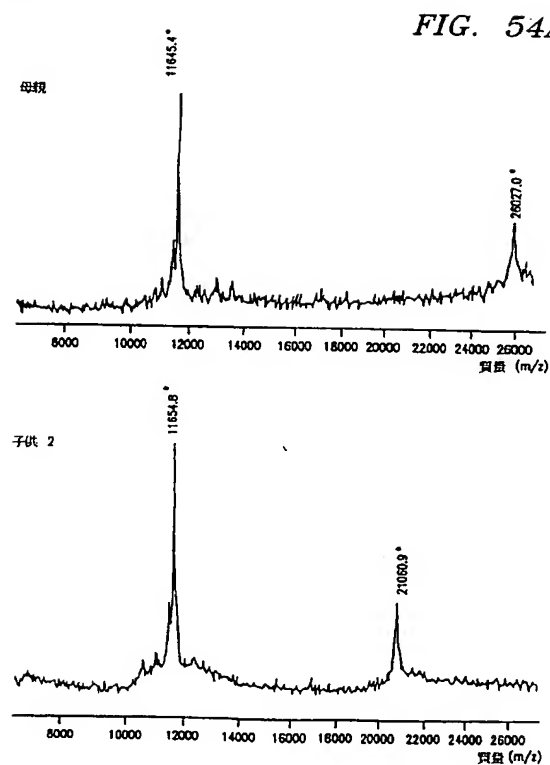


FIG. 52

【圖 5 3】



【图 5-4】



【図55】

5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGT (T) (T) AACAGCGATTGCGCATTTTCAGA-3'
 プライマー
 T5 対立遺伝子 CAAAA -- TTGTGCGCTAAACCGCTT (4448.0)
 T7 対立遺伝子 CAAAA AA TTGTGCGCTAAACCGCTT (7815.0)
 T9 対立遺伝子 CAAAA AA AA TTGTGCGCTAAACCGCTT (8139.4)

FIG. 55

【図56】

FIG. 56A

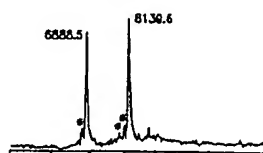
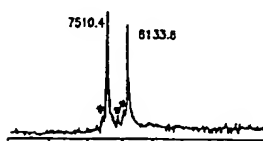


FIG. 56B



【図57】

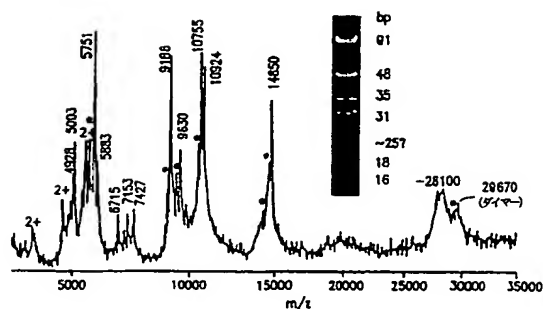


FIG. 57A

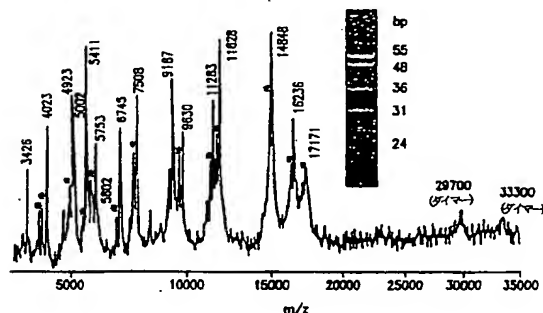


FIG. 57B

【図58】

FIG. 58A

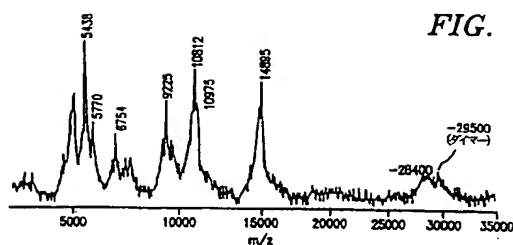


FIG. 58B

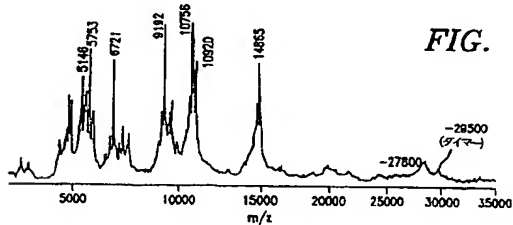
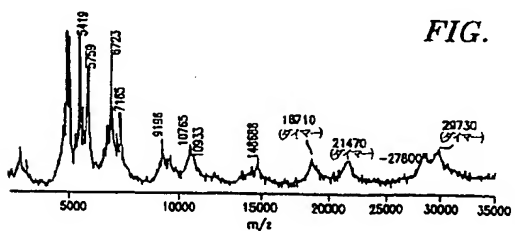


FIG. 58C



【図59】

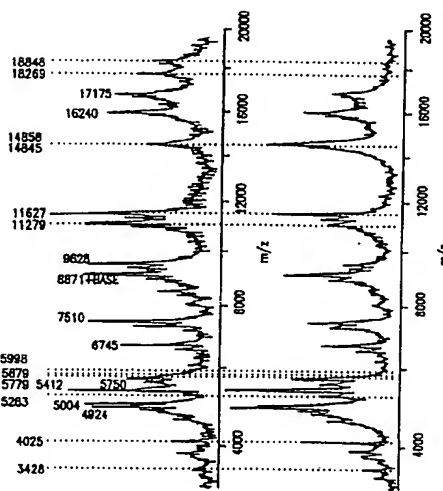


FIG. 59A

FIG. 59B

【図 6 3】

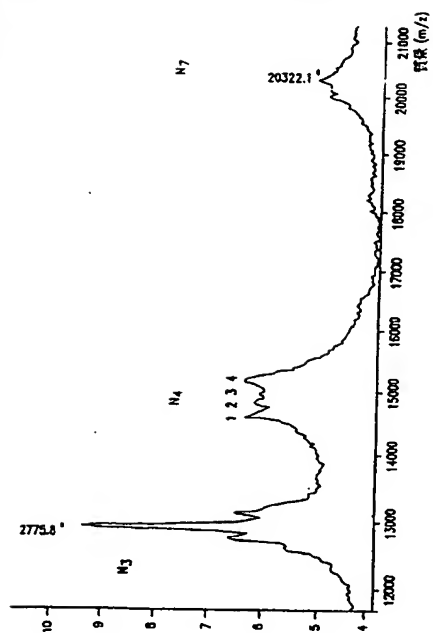


FIG. 63

【図 6 4】

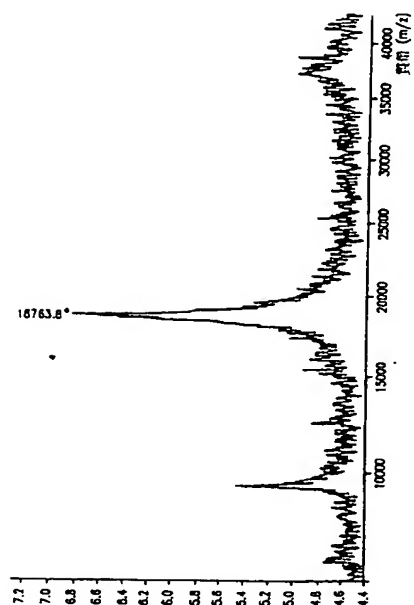


FIG. 64

【図 6 5】

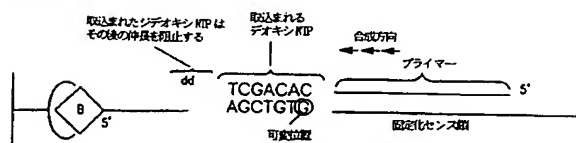


FIG. 65A

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| ddTTP + dNTP (N=A,C,G) | ddATP + dNTP (N=C,T,G) |
| CCG CTG CGA TCA CCG TGC GG C ACA GCT | CCG CTG CGA TCA CCG TGC GG C A |
| 野生型 8246 Da | 野生型 6721 Da |
| CCG CTG CGA TCA CCG TGC GG T | CCG CTG CGA TCA CCG TGC GG T A |
| 6423 Da | 6736 Da |
| CCG CTG CGA TCA CCG TGC GG A ACA GCT | CCG CTG CGA TCA CCG TGC GG A |
| 6270 Da | 6432 Da |

FIG. 65B

【図 6 6】

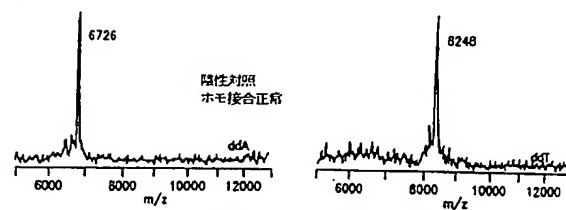


FIG. 66A

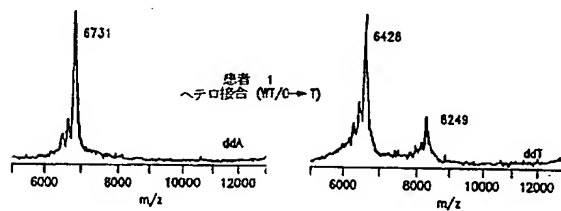


FIG. 66B

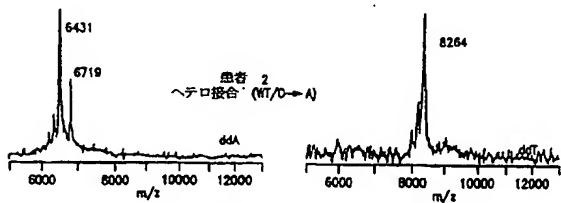


FIG. 66C

【図67】

FIG. 67A

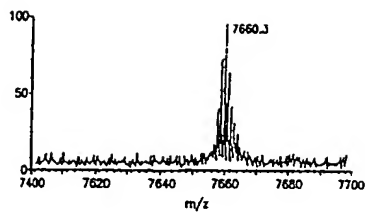


FIG. 67B

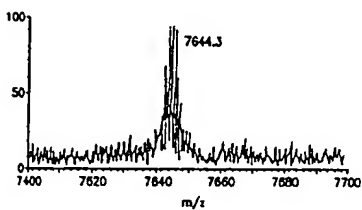
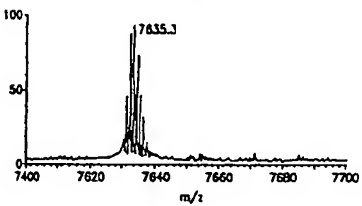


FIG. 67C



【図67】

FIG. 67D

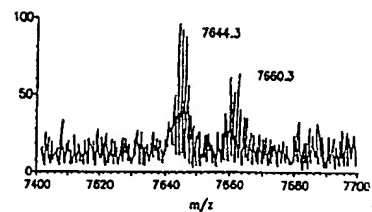


FIG. 67E

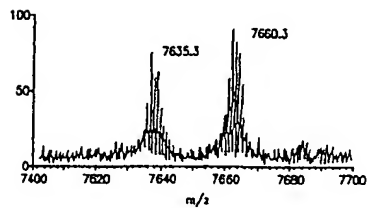
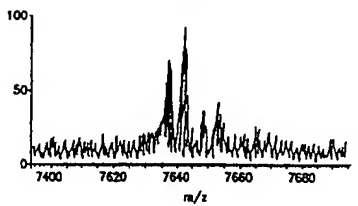


FIG. 67F



【図68】

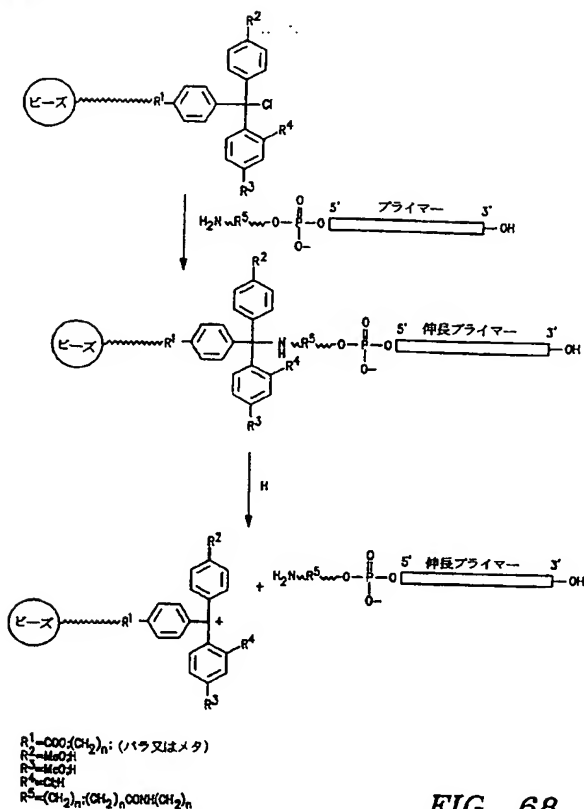


FIG. 68

【図69】

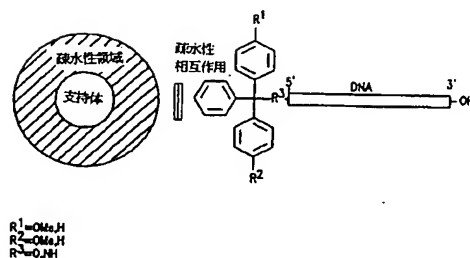


FIG. 69

【図70】

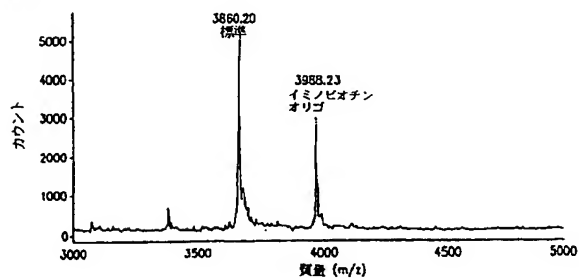


FIG. 70

【图 7-1】

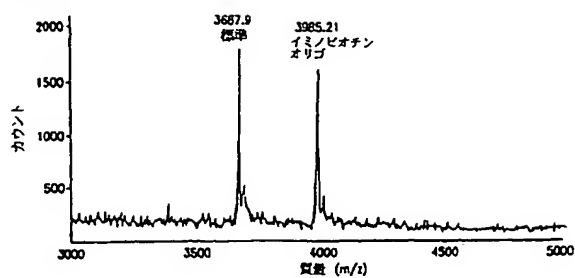
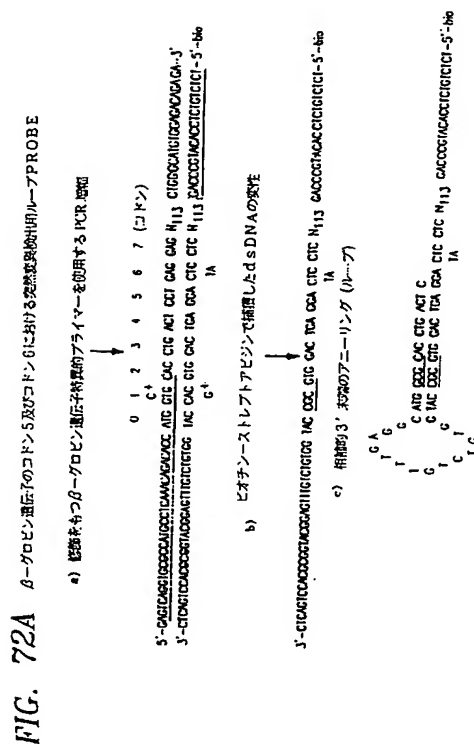
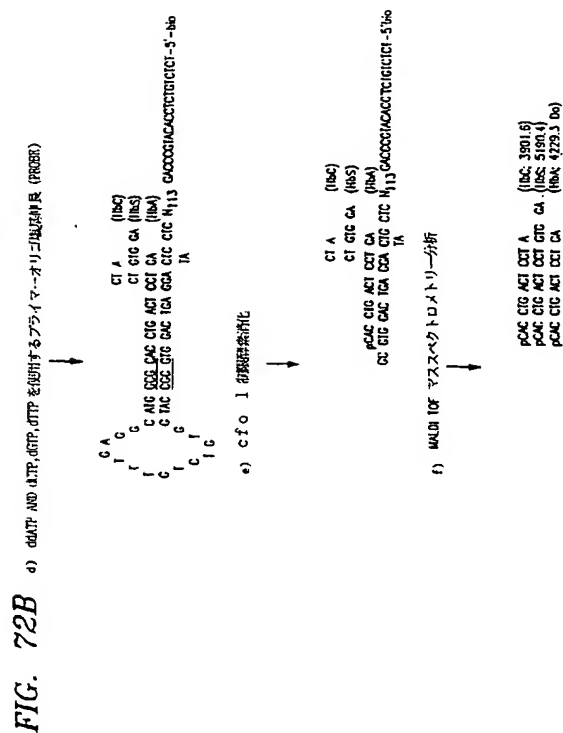


FIG. 71

【图 7-2】



【圖 7 2】



【圖 7 3】

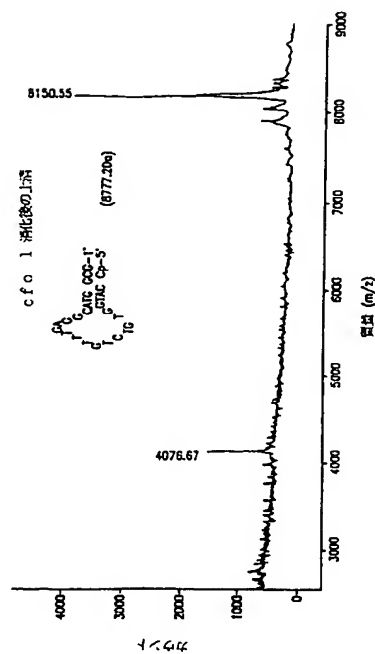


FIG. 73A

【図 7 3】

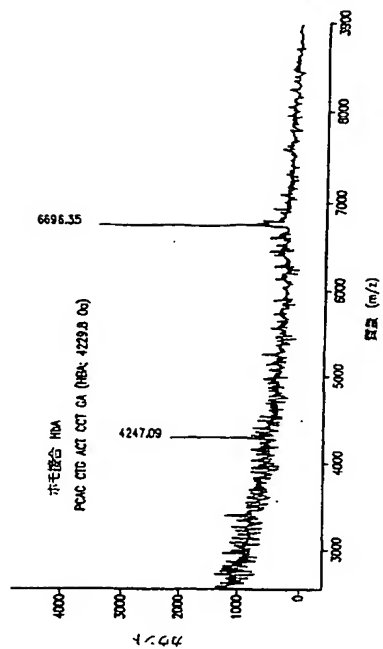


FIG. 73B

【図 7 3】

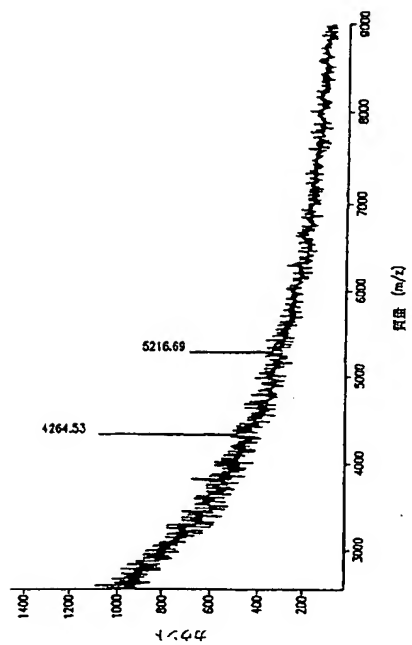


FIG. 73C

【図 7 3】

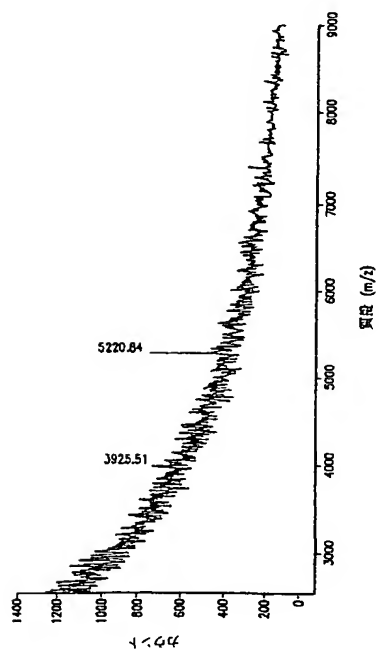


FIG. 73D

【図 7 5】

5' ACCTAGCGTTTCAGTTGCGACTGAGATAATACGACTCATATACGAGCTCTCATTTTCCATAC3'
ランダム配列 17 プロモーター配列 CKR-5 H167

FIG. 75

【図 7 4】

5' CAGCTCTCATTTTCCATACAGCTCAGTATCAATTCTGGAAGATTTCAGACATTAA
GATAGTCATCTTGGGCT 3'

FIG. 74

【図76】

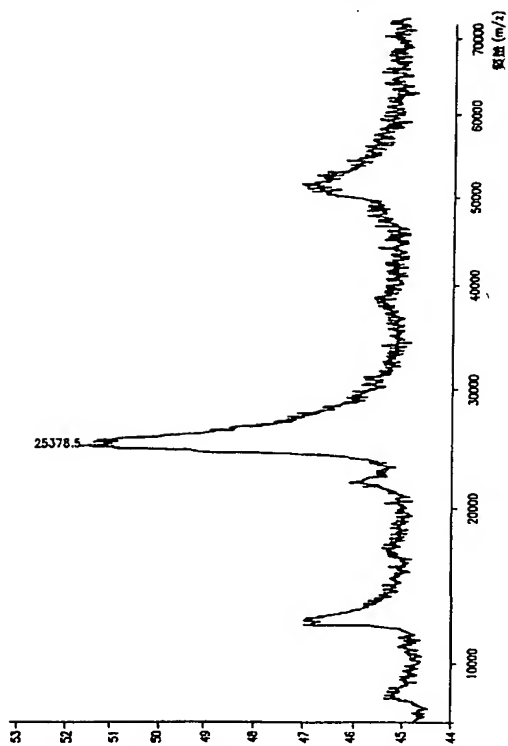
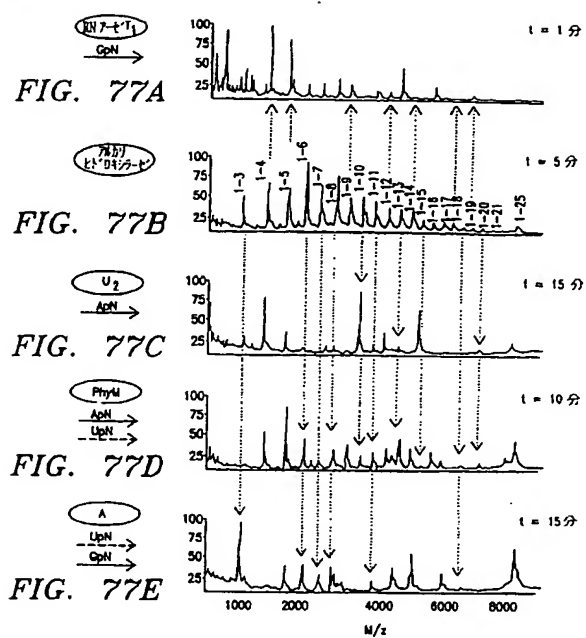


FIG. 76

【図77】



【図78】

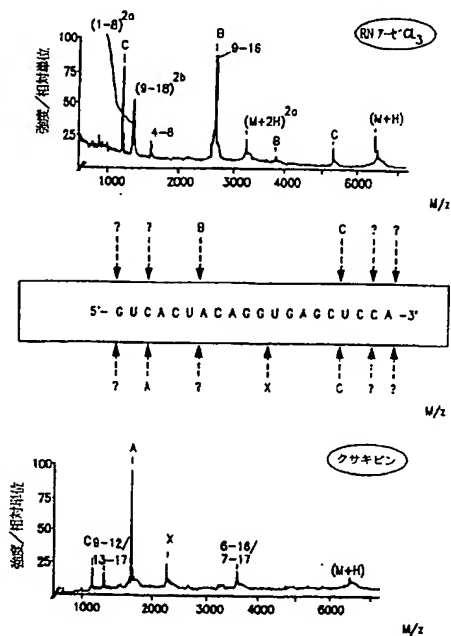


FIG. 78

【図79】

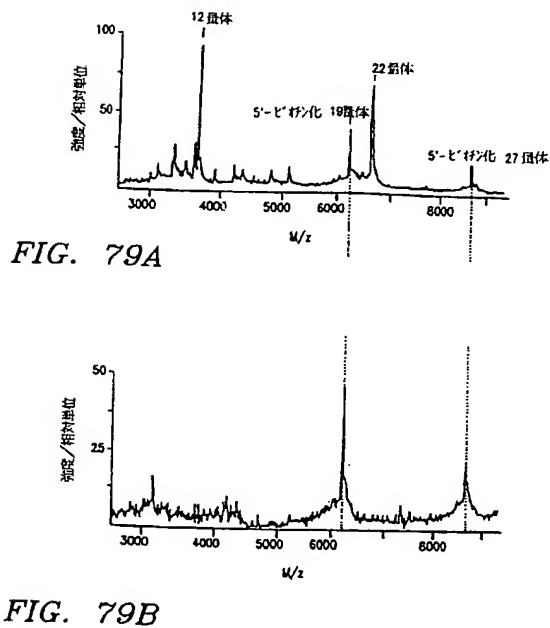


FIG. 79B

【図 8 0】

FIG. 80A

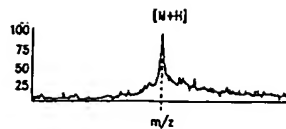


FIG. 80B

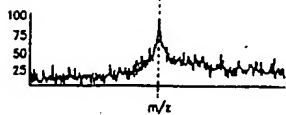


FIG. 80C



FIG. 80D

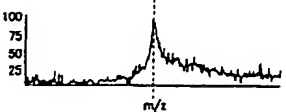
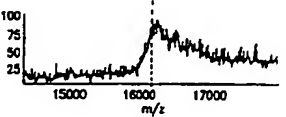


FIG. 80E



【図 8 2】

FIG. 82A

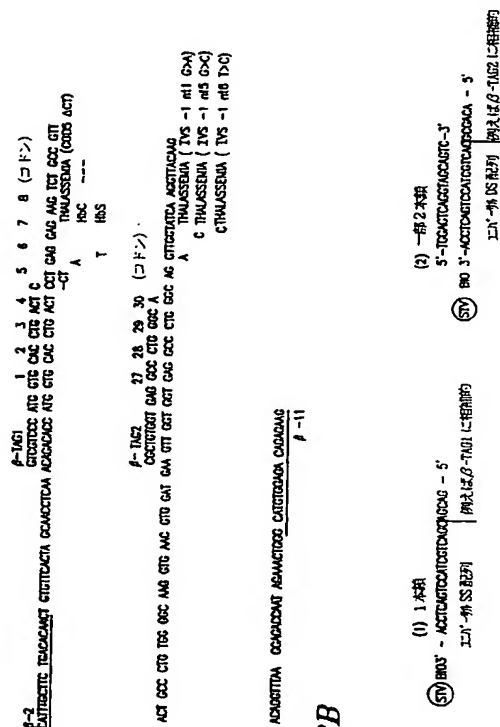


FIG. 82B

【図 8 1】

特表 2002-507883

FIG. 81A

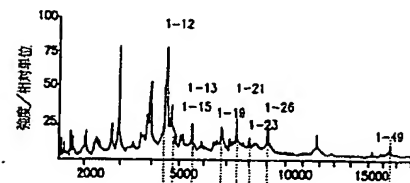
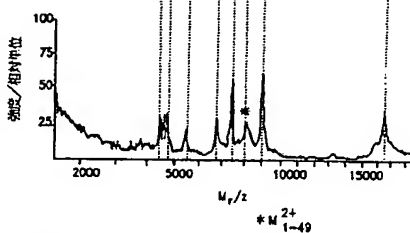


FIG. 81B



【図 8 3】

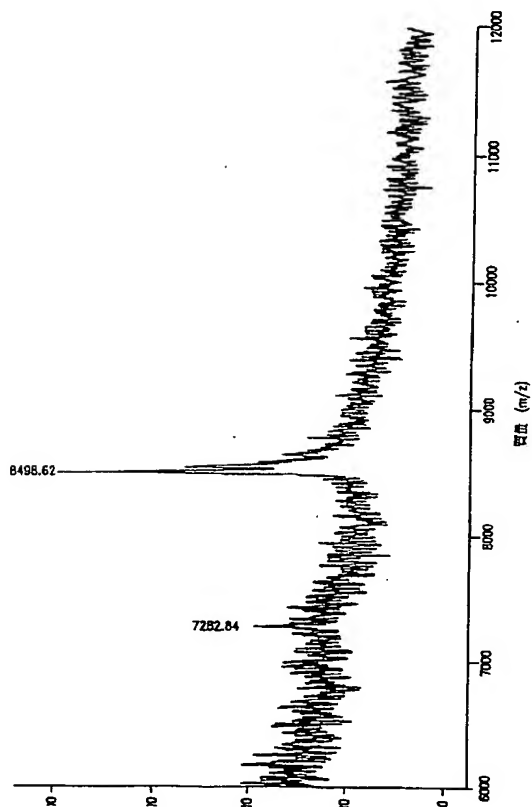


FIG. 83

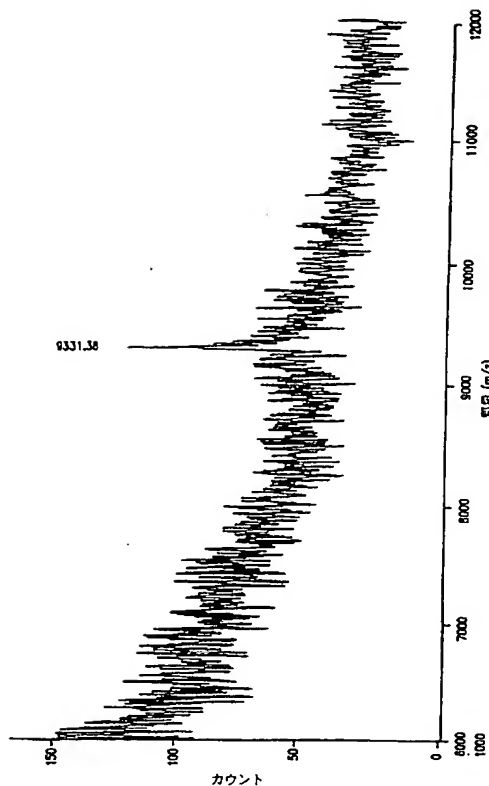


FIG. 84

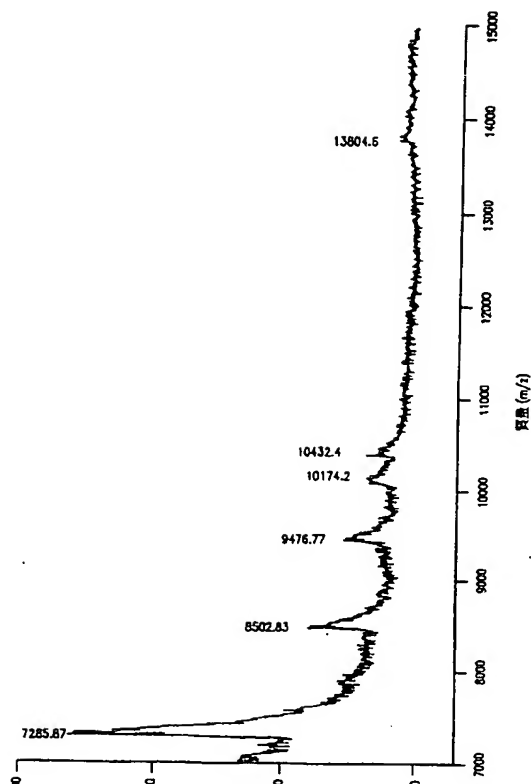


FIG. 85

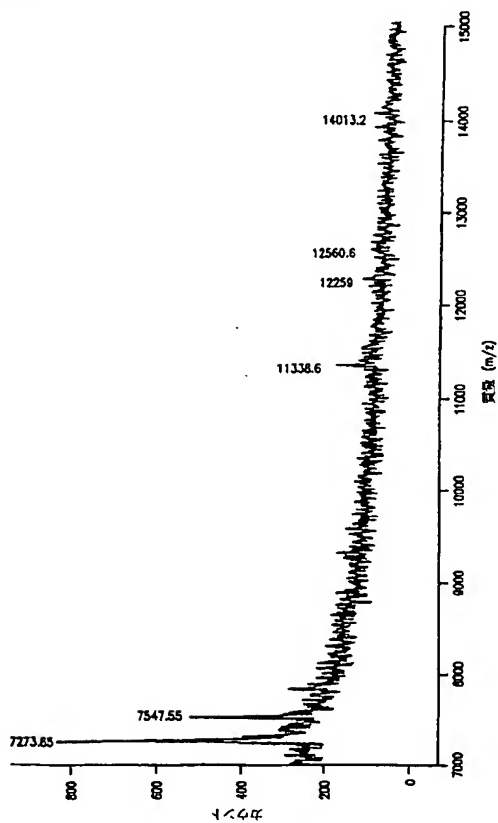


FIG. 86

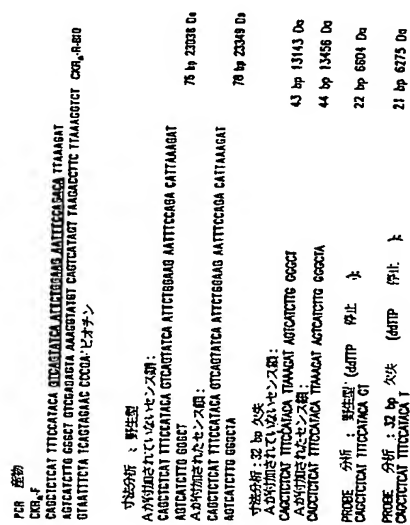


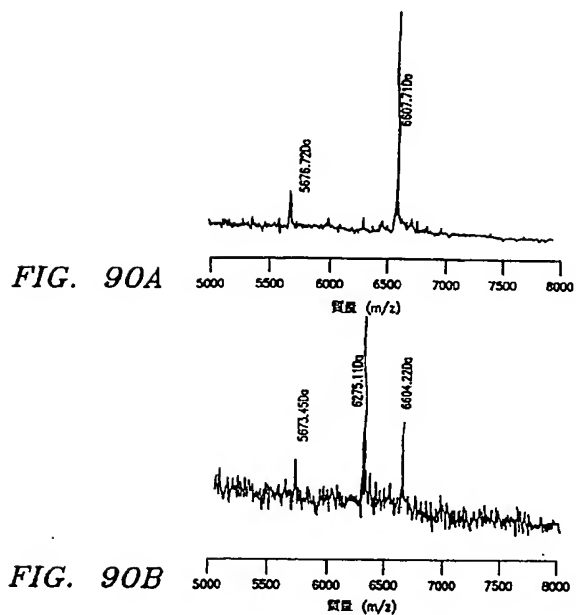
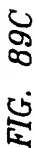
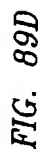
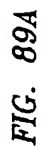
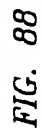
FIG. 87A

FIG. 87B

FIG. 87C

FIG. 87D

FIG. 87E



【図 9 1】

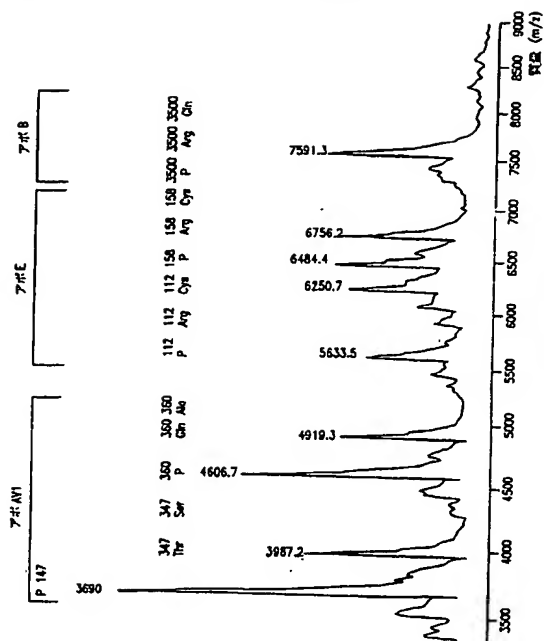


FIG. 91

【図 9 2】

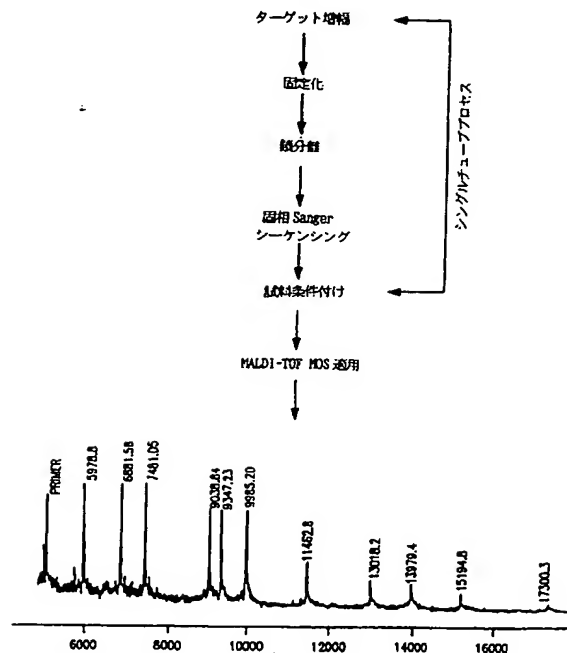


FIG. 92

【図 9 3】

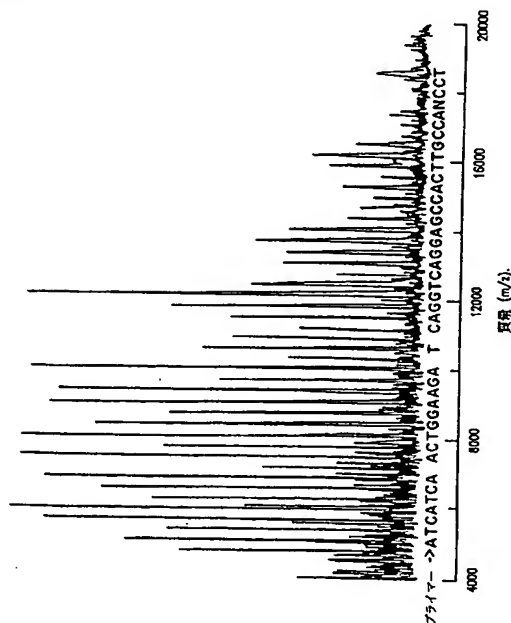


FIG. 93

【図 9 4】

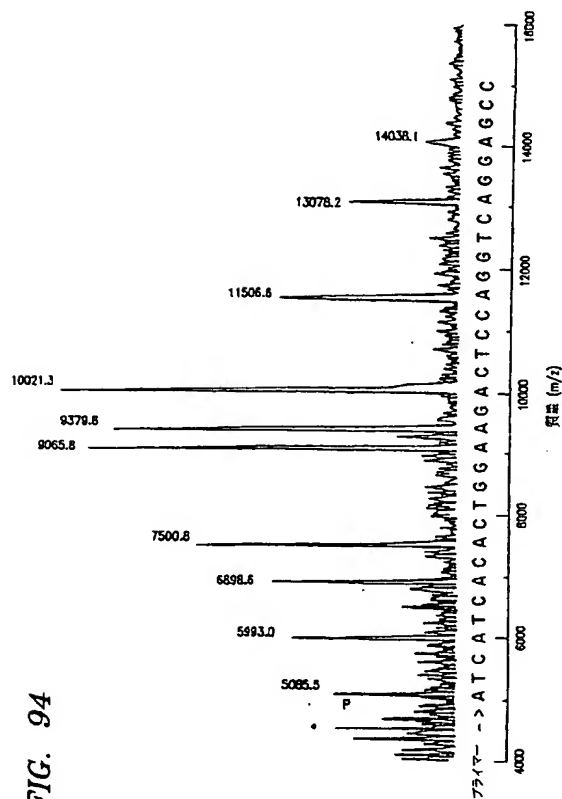


FIG. 94

【図 97】

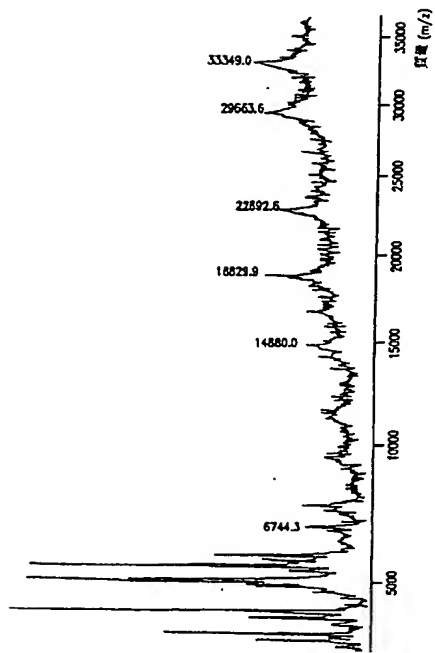


FIG. 97B

【図 98】

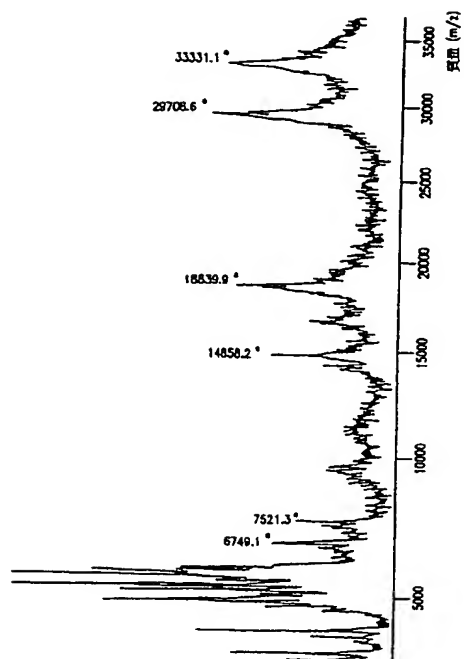


FIG. 98

【図 99】

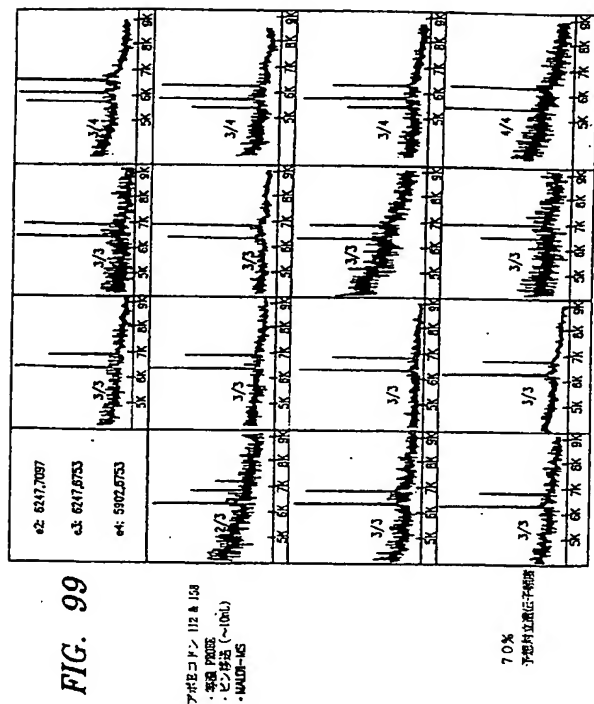


FIG. 99

【図 100】

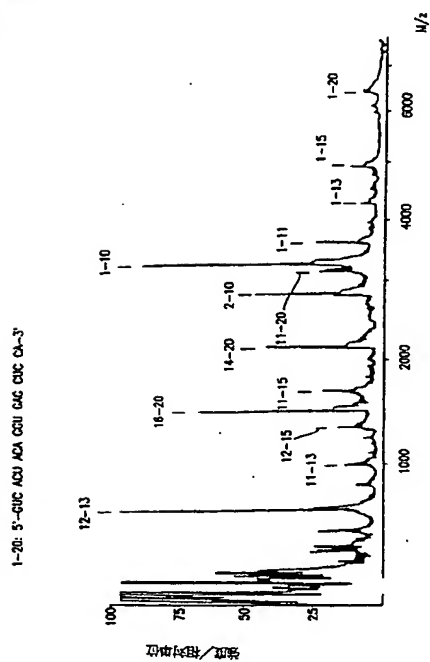


FIG. 100

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年1月28日(1999. 1. 28)

【補正内容】

f) 試料をイオン化/揮発させる段階と、
g) 伸長DNAの質量を検出し、質量によって野生型対立遺伝子が存在するか又は突然変異対立遺伝子が存在するかを判断し、コドンに突然変異対立遺伝子が存在する場合には新形成であると診断する段階を含む。1態様では、伸長-MS分析を使用してレトロウイルス(RET)癌遺伝子における突然変異コドン634の存在を検出する。

別の態様では、形質転換細胞で発現される遺伝子の逆転写と増幅を使用して疾患を診断する方法を提供する。特に、腫瘍細胞では発現されるが、正常骨髄細胞等の正常細胞では発現されないカテコールアミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの逆転写酵素(RT)-MSを使用して神経芽細胞腫を診断する方法を提供する。本方法は、

- a) 組織試料を得る段階と、
- b) 試料からポリA RNAを単離する段階と、
- c) 逆転写を使用してcDNAライブラリーを調製する段階と、
- d) 1個のオリゴプライマーがリンカー部分をもつようにして選択した遺伝子のcDNA産物又はその一部を増幅する段階と、
- e) リンカー部分を介してDNAを固体支持体に固定化するこ

とにより増幅産物を単離する段階と、

f) 場合によりDNAを条件付ける段階と、

g) 試料をイオン化/揮発させ、選択した遺伝子の発現を表すDNAピークの存在を検出する段階を含む。例えば、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子の発現は神経芽細胞腫を表す。

別の態様では、ターゲット核酸から特定末端をもつフラグメントを生成し、マスペクトロメトリーにより各フラグメントの質量を測定し、フラグメントを並

べ、特異的多量増幅産物、PROBE産物の単離等に使用することができる。サイクルシーケンシング等の慣用方法と慣用容量を使用することができる。汎用チップデザインにより多種多様のアプリケーションを利用できる。更に、この方法は高スループットを得るために自動化することができる。

実施例23

マスペクトロメトリーによる欠失検出

種々のフォーマットを利用して遺伝子内の欠失をマスペクトロメーターにより検出することができる。例えば、上記実施例に記載したように2本鎖増幅産物の分子量を測定したり、2本鎖産物の一方又は両方の鎖を単離して質量を測定することができる。

あるいは、本実施例に記載するように、特異的酵素反応を実施し、対応する産物の質量をマスペクトロメトリーにより測定することもできる。欠失寸法は数十塩基長までとすることができ、この場合も野生型と突然変異対立遺伝子の同時検出が可能である。特異的産物の同時検出により、個体が特異的対立遺伝子又は突然変異のホモ接合であるかヘテロ接合であるかを1

回の反応で同定することが可能である。

材料と方法

ゲノムDNA

白血球ゲノムDNAは無関係の健康個体から得た。

PCR増幅

ターゲットDNAのPCR増幅は、ストレプトアビジンをコートしたビーズを捕獲する後期精製段階を実施せずに反応産物を使用できるように設定及び至適化した。ターゲット増幅及びPROBE反応用プライマーは、

請求の範囲

1. ターゲット核酸分子の特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントの並び方の決定方法であって、

a) ターゲット核酸配列と一方の末端にタグを含む核酸分子を得る段階と、

特表2002-507883

べてより大きいターゲット核酸の配列を決定することにより、比較的大きいターゲット核酸の正確な配列決定が得られる。好ましい態様では、特定末端をもつフラグメントは特定塩基を末端にもつ部分又は完全フラグメントである。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する方法の1例は、例えば転写反応後に塩基特異的リボヌクレアーゼを使用する。好ましい塩基特異的リボヌクレアーゼはT₁-リボヌクレアーゼ(G特異的)、U₂-リボヌクレアーゼ(A特異的)、PhyM-リボヌクレアーゼ(U特異的)及びリボヌクレアーゼA(U/特異的)から選択される。他の有効な塩基特異的リボヌクレアーゼは実施例21に記載するアッセイを使用して同定することができる。修飾ヌクレオチドを未修飾ヌクレオチドと転写反応させることが好ましい。修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドを約1:1の好ましい比率で組み込むように適当な濃度で転写反応に加えると最も好ましい。あるいは、修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドで2回別々にターゲットDNAの転写

を行い、結果を比較してもよい。好ましい修飾ヌクレオチドとしては、ホウ素又は臭素修飾ヌクレオチド(Porterら(1995) Biochemistry 34:11963-11969; Hasanら(1996) Nucleic Acids Res. 24:2150-2157; Lira(1995) Nucleic Acids Res. 23:4495-4501)、 α -チオ修飾ヌクレオチド及び上述のような質量改変ヌクレオチドが挙げられる。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する別の方法は、増幅と塩基特異的ターミネーション反応を併用実施する。例えば、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ酵素による重合が指数的増幅を生じ、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ酵素が重合を停止してシーケンシング産物を生じるように、連鎖停止ヌクレオチドに対して各々異なる親和性をもつ少なくとも2種の異なるポリメラーゼ酵素を使用して増幅とターミネーション反応を併用実施することができる。

捕獲は1個の反応チューブ/ウェルから異なるシーケンシングプライマーの分離

b) ターゲット核酸から特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントを生成する段階と、

c) フラグメントをマスペクトロメトリーフォーマットにより分析し、ターゲット核酸分子中の特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントの並び方を決定する段階を含む前記方法。

2. 段階b)においてヌクレアーゼをターゲット核酸と接触させ、特定塩基末端をもつ核酸フラグメントを生成する請求項1に記載の方法。

3. ヌクレアーゼがターゲット核酸中の少なくとも1個の制限部位を認識し、これを開裂することが可能な制限酵素である請求項2に記載の方法。

4. ターゲット核酸がデオキシリボ核酸であり、ヌクレアーゼがデオキシリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。

5. ターゲット核酸がリボ核酸であり、ヌクレアーゼがリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。

6. リボヌクレアーゼがG特異的T₁リボヌクレアーゼ、A特異的U₂リボヌクレアーゼ、A/U特異的PhyMリボヌクレアーゼ、U/C特異的リボヌクレアーゼA、C特異的ニワトリ肝リボヌクレアーゼ及びクリサピチンから構成される群から選択される請求項5に記載の方法。

7. 段階b)において増幅と特定塩基ターミネーション反応の併用実施により特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する請求項1に記載の方法。

8. 増幅と特定塩基ターミネーション反応の併用が、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもつ第1のポリメラーゼと、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ第2のポリメラーゼを使用して実施される請求項7に記載の方法。

9. 第1及び第2のポリメラーゼが熱安定DNAポリメラーゼである請求項8に記載の方法。

10. 熱安定DNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼ、AmpliTaq FS DNAポリメラーゼ、Deep

Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Deep Vent DNAポリメラーゼ、Thermo Sequenase、exo (-) Pseudococcus furiosus (Pfu) DNAポリメラーゼ、AmpliTaq、Ultiman、9 degree Nm、Tth、Hot Tub、Pyrococcus furiosus (Pfu) 及び Pyrococcus woesei (Pwo) DNAポリメラーゼから構成される群から選択される請求項9に記載の方法。

11. 段階b)で生成される特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントが質量変異ヌクレオチドを含む請求項1に記載の方法。

12. タグが3' タグを含む請求項1に記載の方法。

13. タグが5' タグを含む請求項1に記載の方法。

14. タグが非天然タグである請求項1又は13に記載の方法。

15. 非天然タグがアフィニティタグ及び質量マーカーから構成される群から選択される請求項14に記載の方法。

16. アフィニティタグが核酸の固体支持体固定化を助長する

請求項15に記載の方法。

17. アフィニティタグがビオチン又は固体支持体に結合した捕獲核酸配列に結合することが可能な核酸配列である請求項16に記載の方法。

18. 生物試料中に存在するターゲット核酸の検出方法であって、

a) ターゲット核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマーを使用し、核酸又は第1組のプライマー中のプライマーを請求項9 2から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して固体支持体に固定化し、生物試料から得られた核酸で第1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、増幅産物を生成する段階と、

b) 増幅産物をマスマススペクトロメトリーにより検出し、増幅産物が検出された場合には生物試料中にターゲット核酸が存在すると判断する段階を含む前記方法。

27. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物の脱プリン感度を低下させる少なくとも1種のヌクレオチドを加えることにより条件付けを行う請求項23に記載の方法。

28. ヌクレオチドがN7-デアザプリンヌクレオチド、N9-デアザプリンヌクレオチド又は2'-フルオロ-2'-デオキシヌクレオチドである請求項27に記載の方法。

29. 組織又は細胞試料中の新形成/悪性の検出方法であって、テロメラーゼをコードするか又は癌遺伝子の突然変異に特異的であるか又は腫瘍特異的遺伝子をコードする核酸をマスマス

ペクトロメトリーにより検出することにより試料中のテロメラーゼ活性、癌遺伝子の突然変異、腫瘍特異的遺伝子の発現を検出することを特徴とする前記方法。

30. 組織又は細胞試料中の新形成/悪性の検出方法であって、

a) 試料からテロメラーゼを単離し、合成DNAのテロメラーゼ特異的伸長を生じる条件下で、場合により固定化したテロメラーゼに相補的な合成DNAプライマーと全4種のデオキシヌクレオチド三リン酸を加える段階と、

b) テロメラーゼ伸長DNA産物を増幅する段階と、

c) DNA産物をマスマススペクトロメトリーにより検出し、テロメラーゼ特異的伸長が検出された場合には新形成/悪性と判断する段階を含む請求項29に記載の方法。

31. プライマーが支持体に固定化するためのリンカー部分を含み、リンカー部分を固体支持体に結合することにより増幅プライマーを単離する請求項30に記載の方法。

32. 生物試料中のテロメラーゼ活性の検出方法であって、

a) 生物試料と、テロメラーゼ活性により伸長することが可能な基質プライマーと、完全な1組のデオキシヌクレオチド三リン酸をインキュベートする段階と、

b) テロメラーゼ伸長基質プライマーをマスマススペクトロメトリーにより検出し、生物試料中のテロメラーゼ活性を検出する段階を含む前記方法。

19. 生物試料中に存在するターゲット核酸の検出方法であって、

a) ターゲット核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマーを使用し、生物試料から得られた核酸で第

1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、第1の増幅産物を生成する段階と、

b) ターゲット核酸を含む第1の増幅産物の少なくとも一部を増幅することが可能な第2組のプライマーを使用し、第1の増幅産物で第2回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、第2の増幅産物を生成する段階と、

c) 第2の増幅産物をマスマススペクトロメトリーにより検出し、第2の増幅産物が検出された場合には生物試料中にターゲット核酸が存在すると判断する段階を含み、核酸又は第1組のプライマー中のプライマーもしくは第2組のプライマー中のプライマーは請求項9 2から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して固体支持体に固定化する前記方法。

20. ターゲット核酸を固体支持体に固定化し、固定化したターゲット核酸をマスマススペクトロメトリー中に支持体から開裂する請求項18又は19に記載の方法。

21. 固体支持体がビーズ、平坦表面、チップ、キャピラリー、ピン、コーム及びビューハから構成される群から選択される請求項18又は19に記載の方法。

22. マスマススペクトロメトリーの前にターゲット核酸を精製す

る請求項18又は19に記載の方法。

23. プライマー又は増幅産物を条件付けする請求項18又は19に記載の方法。

24. プライマー又は増幅産物をホスホジエステル主鎖修飾により条件付けする請求項23に記載の方法。

25. ホスホジエステル主鎖修飾がカチオン交換である請求項24に記載の方法。

26. プライマー又は増幅産物をアルキル化剤又は塩化トリアルキルシリルとの接触により条件付けする請求項23に記載の方法。

33. 基質プライマーを固体支持体に固定化する請求項32に記載の方法。

34. 基質プライマーを固体支持体にアレー状に固定化する請求項33に記載の方法。

35. テロメラーゼ伸長基質プライマーをマスマススペクトロメトリーの前に増幅する段階を更に含む請求項32に記載の方法。

36. 突然変異癌遺伝子により形質転換した細胞又は組織の同定方法であって、

a) 1個のプライマーが固定化のためのリンカー部分を含むようにして細胞又は組織試料中で形質転換を表すコドンを含む癌遺伝子の一部を増幅する段階と、

b) 場合によりアレーの形態で固体支持体にリンカー部分を介してDNAを固定化する段階と、

c) コドンの上流の癌遺伝子配列に相補的なプライマーをハイブリダイズする段階と、

d) 3 dNTP / 1 d dNTP とDNAポリメラーゼを加え、

ハイブリダイズしたプライマーを次のd dNTPロケーションまで伸長する段階と、

e) 試料をイオン化/揮発させる段階と、

f) 突然変異癌遺伝子を表す伸長したDNAの質量を検出し、突然変異癌遺伝子により形質転換した細胞又は組織を同定する段階を含む請求項29に記載の方法。

37. 癌遺伝子がRET癌遺伝子である請求項36に記載の方法。

38. 形質転換を表すコドンがRET癌遺伝子のコドン634である請求項37に記載の方法。

39. 腫瘍特異的遺伝子の発現の検出方法であって、

a) ポリA RNAを試料から単離する段階と、

b) 逆転写を使用してcDNAライブラリーを調製する段階と、

c) 1個のリンカー部分を含む1組のプライマーを使用して腫瘍特異的遺伝子のcDNA産物又はその一部を増幅する段階と、

- d) リンカー部分を介してDNAを固体支持体に固定化することにより増幅産物を単離する段階と、
- e) 場合によりDNAを条件付けする段階と、
- f) 試料をイオン化/揮発させ、遺伝子の発現を表すDNAビ

ークの存在を検出する段階を含む請求項29に記載の方法。

40. 細胞が骨髄細胞であり、遺伝子がチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子であり、遺伝子の発現が神経芽細胞腫を表す請求項39に記載の方法。

41. マトリックス助剤レーザーデソープション/イオン化飛行時間(MALDI-TOF) マススペクトロメトリーを使用する2本鎖核酸の直接検出方法であって、

- a) 細胞又は組織試料から2本鎖DNAフラグメントを単離する段階と、
- b) dsDNA: ssDNA比を増加する条件として、約4℃以下の温度で分析用試料を調製することと、マトリックス中で高いDNA濃度を使用してデュプレクス形成を誘導することのうちの一方又は両方を含む条件下で分析用2本鎖DNAを調製する段階と、
- c) 低い加速電圧を使用して段階b)のDNAをイオン化/揮発させる段階と、
- d) MALDI-TOFマススペクトロメトリーにより2本鎖DNAの存在を検出する段階を含む前記方法。

42. 血縁関係を認識又は突然変異を検出するためのDNA試

料の比較方法であって、

- a) 複数の生物試料を得る段階と、
- b) 2個以上のマイクロサテライトDNA反復配列を含む各試料からのDNA領域を増幅する段階と、
- c) 増幅したDNAの存在をマススペクトロメトリーにより各試料から検出し、増幅したDNAの分子量を比較し、分子量が異なる場合には試料間に不一致又は突然変異が存在すると判断する段階を含む前記方法。

43. 不一致が1個の試料中のDNAにおける突然変異の存在、試料を採取した

て、

- a) ターゲット配列又はその補体に相補的な配列とRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列を含むプライマーを使用してターゲット核酸を増幅する段階と、
- b) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼを使用してRNAを合成する段階と、
- c) マススペクトロメトリーを使用して得られたRNAを検出し、生物試料中のターゲット核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法。

50. ターゲット核酸配列の存在の検出方法であって、

- a) i) RNAポリメラーゼと、
- ii) スクレオシド三リン酸と、
- iii) ターゲット核酸配列又はその補体とRNAポリメラーゼのプロモーターを含む核酸分子を反応混合物中でインキュベートし、ターゲット核酸配列又はその補体を含むRNA分子

を生成する段階と、

- b) マススペクトロメトリーによりRNA分子を検出し、ターゲット核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法。

51. ターゲット核酸配列を含む核酸分子がDNAであり、RNAポリメラーゼがDNA依存性RNAポリメラーゼである請求項50に記載の方法。

52. 段階a)の後で段階b)の前に、

RNAポリメラーゼを不活化する段階と、

RNアーゼフリーのDNアーゼIを使用してDNAを消化する段階を更に含む請求項51に記載の方法。

53. ターゲット核酸配列の一部に相補的なデテクターオリゴヌクレオチドを、ターゲット核酸配列を含むRNA分子にハイブリダイズする段階と、ハイブリダイズしなかったデテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階を更に含み、

段階b)において、ハイブリダイズしたデテクターオリゴヌクレオチドを検出す

個体間の非血縁関係又はHLA不適合性を表す請求項42に記載の方法。

44. 複数のマーカーを同時に試験する請求項42又は43に記載の方法。

45. 核酸配列中のターゲットヌクレオチドの同定方法であって、

- a) (i) ターゲットヌクレオチドのすぐ下流の核酸配列の一部に一致する5'末端と、唯一の制限エンドヌクレアーゼ部位をコードする配列と、自己相補的な3'末端をもつ第1のプライマーと、

(ii) リンカー部分を含む第2の下流プライマーを使用してターゲットヌクレオチドを含む核酸配列の少なくとも一部を増幅し、ターゲットヌクレオチドを含む核酸配列の少なくとも一部を含む増幅2本鎖核酸を生成する段階と、

b) リンカー部分を介して増幅2本鎖核酸を固体支持体に固定化する段階と、

c) 固定化核酸を変性させ、非固定化鎖を単離する段階と、

d) 3'末端をポリメラーゼにより伸長できるように、単離した非固定化鎖の3'末端の内部相補的配列をアニールし、自己アニールした核酸を生成する段階と、

f) ポリメラーゼと3dNTPと欠損dNTPに対応する1ddNTPと共にインキュベートすることにより、自己アニールした核酸を伸長し、伸長核酸を生成する段階と、

g) 伸長した核酸を前記唯一の制限エンドヌクレアーゼ部位に特異的な制限エンドヌクレアーゼで間裂する段階と、

h) ターゲットヌクレオチドを同定する段階を含む前記方法。

46. ターゲットヌクレオチドの同定が核酸配列中の突然変異を表す請求項45に記載の方法。

47. 伸長した核酸の質量に基づいてターゲットヌクレオチド

を同定する請求項45に記載の方法。

48. 伸長した核酸の質量をマススペクトロメトリーにより測定する請求項46に記載の方法。

49. RNA増幅を使用して生物試料中のターゲット核酸を検出する方法であっ

ることによりターゲット核酸配列を含むRNA分子を検出する請求項50に記載の方法。

54. ターゲット核酸配列の存在の検出方法であって、

- a) ターゲット配列又はその補体の少なくとも一部に相補的な配列とRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列を含むプライマーを使用してターゲット核酸配列を増幅し、ターゲット核酸又はその補体とRNAポリメラーゼプロモーターを含む増幅核酸分子を生成する段階と、

b) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼ及びヌクレオシド三リン酸と共に増幅核酸分子をインキュベートし、ターゲット核酸配列に対応するRNAを生成する段階と、

c) マススペクトロメトリーを使用してRNAを検出し、ターゲット核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法。

55. 生物試料中に存在するターゲット核酸配列の検出方法であって、

a) 生物試料からターゲット核酸配列を含む核酸分子を得る段階と、

b) マススペクトロメトリーを使用して検出するに十分な密度でターゲット核酸配列が存在するように、チオール結合を介してターゲット核酸配列を固体支持体に固定化する段階と、

c) デテクターオリゴヌクレオチドをターゲット核酸配列とハイブリダイズする段階と、

d) ハイブリダイズしなかったデテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階と、

e) 段階c)の産物をイオン化及び揮発させる段階と、

f) デテクターオリゴヌクレオチドをマススペクトロメトリーにより検出し、デテクターオリゴヌクレオチドが検出される場合には生物試料中にターゲット核酸配列が存在すると判断する段階を含む前記方法。

56. ターゲット核酸配列を固定化前に増幅する請求項55に記載の方法。

57. デテクターオリゴヌクレオチド又はターゲット核酸配列の少なくとも一方

を条件付けておく請求項55又は56に記載の方法。

58. 固体支持体がビーズ、平坦表面、ピン及びコームから構成される群から選択される請求項55から57のいずれか一項に記載の方法。

59. ターゲット核酸をアレーの形態で固定化する請求項55から58のいずれか一項に記載の方法。

60. 支持体がシリコンウェハである請求項55から59のいずれか一項に記載の方法。

61. クローニング、転写、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応及び鎖置換増幅から構成される群から選択される増幅法によりターゲット核酸配列を増幅する請求項55から60のいずれか一項に記載の方法。

62. マススペクトロメーターがマトリックス助剤レーザーデソープション/イオン化飛行時間、エレクトロスプレー、イオンサイクロトロン共鳴及びフーリエ変換から構成される群から選択される請求項55から61のいずれか一項に記載の方法。

63. 少なくとも2種のデテクターオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド模倣体に質量差をつけ、少なくとも2種のターゲット核酸配列を同時に検出及び区別することにより試料を条件付けする請求項55から62のいずれか一項に記載の方法。

64. 少なくとも2種のオリゴヌクレオチドの長さ又は配列の相違により質量差をつける請求項63に記載の方法。

65. デテクターオリゴヌクレオチドの塩基、糖又はリン酸部分に質量改変官能基を導入することにより質量差をつける請求項64に記載の方法。

66. ホスホジエステル結合におけるカチオン交換により質量差をつける請求項63に記載の方法。

67. マススペクトロメーター検出前に質量改変ジデオキシヌクレオシド三リン酸とDNA依存性DNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をDNAに増幅する請求項55から66のいずれか一項に記載の方法。

74. 共有結合がN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエートを介して行われる請求項71から73のいずれか一項に記載の方法。

75. 核酸が2'-デオキシリボ核酸(DNA)である請求項71又は72に記載の方法。

76. 核酸がリボ核酸(RNA)である請求項71又は72に記載の方法。

77. エキソヌクレアーゼがヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、Ba1-31ヌクレアーゼ、大腸菌エキソヌクレアーゼI、大腸菌エキソヌクレアーゼVII、マングマヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ活性、DNAポリメラーゼIのK11 exonucleaseのエキソヌクレアーゼ活性、T4 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、T7 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、Taq DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、DEEP VENT DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、大腸菌エキソヌクレアーゼII、λエキソヌクレアーゼ及びVENTa DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性から構成される群から選択

される請求項71から76のいずれか一項に記載の方法。

78. 核酸が質量改変ヌクレオチドを含む請求項71から77のいずれか一項に記載の方法。

79. 質量改変ヌクレオチドがエキソヌクレアーゼ活性の程度を変更する請求項78に記載の方法。

80. 逐次遊離されるヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ遊離後でマススペクトロメーター同定の前に質量改変する請求項78に記載の方法。

81. 逐次遊離されるヌクレオチドをアルカリホスファターゼと接触させて質量改変する請求項80に記載の方法。

82. マススペクトロメーターフォーマットがマトリックス助剤レーザーデソープションマススペクトロメーター又はエレクトロスプレーマススペクトロメーターである請求項71から81のいずれか一項に記載の方法。

83. a) 支持体の表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランの溶液と反応

68. マススペクトロメーター検出前に質量改変リボヌクレオシド三リン酸とDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をRNAに増幅する請求項55から67のいずれか一項に記載の方法。

69. ターゲット核酸配列が遺伝病、染色体異常、遺伝素因、ウイルス感染、真菌感染及び細菌感染から構成される群から選択される疾患又は症状を表す請求項55から68のいずれか一項に記載の方法。

70. デテクターオリゴヌクレオチドがペプチド核酸である請求項50から69のいずれか一項に記載の方法。

71. 核酸の配列の決定方法であって、

a) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、

b) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、個々のヌクレオチドを逐次遊離させる段階と、

c) 逐次遊離したヌクレオチドの各々をマススペクトロメーターにより同定する段階と、

d) 同定したヌクレオチドから核酸の配列を決定する段階を含み、請求項92から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法。

72. 核酸の配列の決定方法であって、

a) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、

b) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、複数の組の入れ子核酸フラグメントを生成する段階と、

c) 核酸フラグメントの組の各々の分子量をマススペクトロメーターにより測定する段階と、

d) 核酸フラグメントの組の分子量から核酸の配列を決定する段階を含み、請求項92から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法。

73. 核酸を少なくとも20 fmol/mm²の密度で支持体の表面に共有結合する請求項71又は72に記載の方法。

させ、支持体の表面に第1級アミンの均質層を生成する段階と、

b) 第1級アミンの均質層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエートの溶液と反応させることによ

り支持体の表面にヨードアセトアミド官能基を付ける段階を含む方法により固定化を実施する請求項71から82のいずれか一項に記載の方法。

84. 配列番号32~38、41~86、89、92、95、98、101~110、112~123、126、128及び129に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。

85. 配列番号1~22、24及び27~32に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。

86. 標識されておらず、場合により、好ましくは5'末端に付けた質量改変部分を含む請求項84又は85に記載のプライマー。

87. 選択的に開裂可能なリンカーを介して核酸を固体支持体に固定化する請求項1から17及び26から69のいずれか一項に記載の方法。

88. リンカーが熱開裂性、酵素開裂性、光開裂性又は化学開裂性である請求項87に記載の方法。

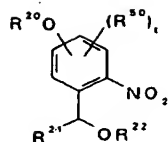
89. リンカーがトリチルリンカーである請求項87に記載の

方法。

90. リンカーが1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロキシ)フェニル)-1-オ-((2-シアノエトキシ)ジソプロピルアミノホスフィノ)エタンと1-(4-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-オ-((2-シアノエトキシ)ジソプロピルアミノホスフィノ)エタンから構成される群から選択される請求項89に記載の方法。

91. プライマーがペプチド核酸である請求項1から90のいずれか一項に記載の方法。

92. 式I:

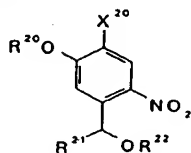


(II)

【式中、R²⁰はω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキル及びω-ヒドロキシアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボ

ニル、アリールオキシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び（ジアルキルアミノ）（ω-シアノアルコキシ）P-から構成される群から選択され、tは0～3であり、R⁵⁰はアルキル、アルコキシ、アリール及びアリールオキシから構成される群から選択される】の化合物を含む光感受性リンカー。

93. リンカーが式I I:



(III)

【式中、R²⁰はω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキル、ω-ヒドロキシアルキル及びアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び（ジアルキルアミノ）（ω-シアノアルコキシ）P-から構成される群から選択され、X²⁰は水素、アル

ルコキシ、アリール又はアリールオキシである】の化合物を含む光感受性リンカー。

98. R²⁴がω-ヒドロキシアルキル又はω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキルであり、アルキル鎖上でメチル基により置換されている請求項97に記載の光感受性リンカー。

99. R²³が水素及び（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノ

エトキシ）P-から構成される群から選択され、R²⁴が3-ヒドロキシプロポキシ、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシ、4-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシ-1-プロピル、1-ヒドロキシ-2-プロピル、3-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル、2-ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、4-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）ブチル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-1-プロピル、2-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）エチル、1-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-プロピル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-メチル-1-プロピル及び4，4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項97に記載の光感受性リンカー。

100. rとsが両方とも0である請求項99に記載の光感受性リンカー。

101. R²³が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-であり、R²⁴が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシ、4-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）ブチル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）

プロピル、2-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）エチル、1-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-プロピル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-メチル-1-プロピル及び4，4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項100に記載の光感受性リンカー。

102. R²⁴が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシである

キル又はOR²⁰から構成される群

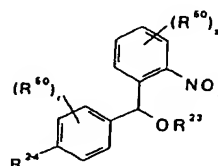
から選択される】で表される請求項92に記載の光感受性リンカー。

94. R²⁰が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピル、3-ヒドロキシプロピル及びメチルから構成される群から選択され、R²¹が水素、メチル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²が水素及び（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-から構成される群から選択され、X²⁰が水素、メチル又はOR²⁰から構成される群から選択される請求項93に記載の光感受性リンカー。

95. R²⁰が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピルであり、R²¹がメチルであり、R²²が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-であり、X²⁰が水素である請求項93に記載の光感受性リンカー。

96. R²⁰がメチルであり、R²¹がメチルであり、R²²が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-であり、X²⁰が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシである請求項93に記載の光感受性リンカー。

97. 式I I I:



(III)

【式中、R²³は水素及び（ジアルキルアミノ）（ω-シアノアルコキシ）P-から構成される群から選択され、R²⁴はω-ヒドロキシアルコキシ、ω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルコキシ、ω-ヒドロキシアルキル及びω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキルから構成される群から選択され、アルキル又はアルコキシ鎖上で1個以上のアルキル基により置換されているもいなくともよく、r及びsは各々独立して0～4であり、R⁵⁰はアルキル、ア

ルコキシ、アリール又はアリールオキシである】の化合物を含む光感受性リンカー。

103. リンカーが1-（2-ニトロ-5-（3-OR-4，4'-ジメトキシトリチルプロポキシ）フェニル）-1-OR-（2-シアノエトキシ）ジイソプロピルアミノホスフィノ）エタンと1-（4-（3-OR-4，4'-ジメトキシトリチルプロポキシ）-3-メトキシ-6-ニトロフェニル）-1-OR-（2-シアノエトキシ）ジイソプロピルアミノホスフィノ）エタンから構成される群から選択される請求項102に記載の光感受性リンカー。

【手続補正書】

【提出日】平成13年2月16日（2001. 2. 16）

【補正内容】

(1) 明細書

- i) 3頁2行目の「感染性生物」を「感染性微生物」と、同頁10行目から13行目にかけての「核酸フラグメントの移動度を…同定することができる。」を「核酸フラグメントの移動度を既知標準と比較することによるゲル電気泳動により又は同定しようとする配列に相補的なプローブとのハイブリダイゼーションにより核酸配列を同定することができる。」と訂正する。
- ii) 8頁下から4行目の「bu」を「by」と訂正する。
- iii) 17頁9行目の「固定化した」を「固定化し」と訂正する。
- iv) 18頁10行目から11行目にかけての「リンカー部分をもつようにして…癌遺伝子」を「リンカー部分をもつようにして、形質転換を示唆するコドンを含む選択源癌遺伝子」と、同頁16行目の「する段階」を「させる段階」と訂正する。
- v) 19頁1行目から20頁5行目にかけての「f）試料をイオン化／…の発現は神経細胞腫を誘発する。」を「f）試料をイオン化／…の発現は神経細胞腫を誘発する。」と訂正する。
- g) 伸長DNAの質量を検出し、質量によって野生型対立遺伝子が存在するか又は突然変異対立遺伝子が存在するかを判断する段階を含み、コドンに突然変異対立遺伝子が存在する場合には新形成であると判断される。1

子における突然変異コドン634の存在を検出する。

別の態様では、形質転換細胞で発現される遺伝子の逆転写と増幅を使用して疾患を診断する方法を提供する。特に、腫瘍細胞では発現されるが、正常骨髄細胞等の正常細胞では発現されないカテコールアミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの逆転写酵素(RT) -MSを使用して神経芽細胞腫を診断する方法を提供する。本方法は、

- a) 組織試料を得る段階と、
- b) 試料からポリA RNAを単離する段階と、
- c) 逆転写を使用してcDNAライブラリーを調製する段階と、
- d) 1個のオリゴプライマーがリンカー部分をもつようにして、選択遺伝子のcDNA産物又はその一部を増幅する段階と、
- e) リンカー部分を介してDNAを固体支持体に固定化することにより増幅産物を単離する段階と、
- f) 場合によりDNAを条件付けする段階と、
- g) 試料をイオン化/揮発させ、選択遺伝子の発現を表すDNAピークの存在を検出する段階を含む。例えば、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子の発現は神経芽細胞腫を表す。」と訂正する。
- vi) 21頁9行目から11行目にかけての「産物は多数の…長さが異なる。」を「産物は多数の反物単位に特異的であるか又は反復領域内の第2の部位突然変異に特異的な塩基の数だけ長さが異なる。」と訂正する。
- vii) 22頁下から3行目の「する5' 末端と」を「し、その一部に」と、同頁下から1行目の「る配列と」を「る配列が続く5' 末端と」と訂正する。
- viii) 23頁3行目の「使用して試料中」を「使用して、試料中」と訂正する。
- ix) 26頁2行目の「捕獲配列は」を「その捕獲配列は」と訂正する。
- x) 27頁5行目の「更に、捕獲配列は」を「更に、その捕獲配列は」と、同頁下から1行目「appと検出しようとするD^{na}」を「同時に検出するappとD^{na}」と訂正する。
- xi) 36頁下から3行目の「図25Bは…HBV陰性の」を「図25Bは核酸

基を末端にもつ部分又は完全フラグメントである。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する方法の1例は、例えば転写反応後に塩基特異的リボヌクレアーゼを使用する。好ましい塩基特異的リボヌクレアーゼはT₁-リボヌクレアーゼ(G特異的)、U₂-リボヌクレアーゼ(A特異的)、PhyM-リボヌクレアーゼ(U特異的)及びリボヌクレアーゼA(U/特異的)から選択される。他の有効な塩基特異的リボヌクレアーゼは実施例2に記載するアッセイを使用して同定することができる。修飾ヌクレオチドを未修飾ヌクレオチドと転写反応させることが好ましい。修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドを約1:1の好ましい比率で組み込むように適当な濃度で転写反応に加えると最も好ましい。あるいは、修飾ヌクレオチドと未修飾ヌクレオチドで2回別々にターゲットDNAの転写を行い、結果を比較してもよい。好ましい修飾ヌクレオチドとしては、ホウ素又は真鍮修飾ヌクレオチド(Porterら(1995) Biochemistry 34:11963-11969; Hasanら(1996) Nuc1. Acids Res. 24:2150-2157; Liら(1995) Nucleic Acids Res. 23:4495-4501)、 α -チオ修飾ヌクレオチド及び上述のような質量改変ヌクレオチドが挙げられる。

特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する別の方法は、増幅と塩基特異的ターミネーション反応を併用実施する。例えば、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもつ酵素による重合が指数的に増幅し、連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ酵素が重合を停止してシーケンシング産物を生じるように、連鎖停止ヌクレオチドに対して各々異なる親和性をもつ少なくとも2種の異なるポリメラーゼ酵素を使用して増幅とターミネーション反応を併用実施することができる。」と訂正する。

- xxii) 120頁4行目から5行目にかけての「をニックする」を「にニックを入れる」と、同頁13行目および14行目の「単位」を「ユニット」と訂正する

(即ちPCR)、血清学的及びドットブロットアッセイに対しHBV陰性である。」と訂正し、同頁下から2行目の「核酸(即ちPCR)に対応する」を削除する。

- xiii) 37頁11行目の「リゴBとT-Gミスマッチ」を「リゴBとともにT-Gミスマッチ」と、同頁同様の「オリゴCとA-Cミスマッチ」を「オリゴCとともにA-Cミスマッチ」と訂正する。
- xiii) 40頁2行目の「反応混合物で」を「反応混合物中で」と訂正する。
- xiv) 52頁3行目の「選択したRNAアーゼ」を「選択RNAアーゼ」と、同頁6行目の「合計約20 pmol」を「各酵素に関し、合計約20 pmol

1」と、同頁8行目の「に固定して各酵素を分析」を「に分析用に固定」と、同頁下から2行目の「開裂の不在」を「開裂しないところ」と訂正する。

- xv) 56頁6行目の「もつ遺伝子」を「ともなう遺伝子」と、同頁8行目の「にからの」を「から得た」と訂正する。
- xvi) 61頁3行目および5行目(5行目には2箇所)の「上添」を「上付き」と訂正する。
- xvii) 62頁下から8行目の「レーベル」を「レーベル (labile)」と、同頁下から2行目の「を除いて」を「だけをとまう」と訂正する。
- xviii) 66頁下から8行目の「樹脂」を「樹脂」と訂正する。
- xix) 92頁6行目の「シリルヌクレオシド間橋」を「シリルヌクレオシド間橋 (silyl internucleoside bridges)」と訂正する。
- xx) 94頁下から1行目および95頁下から9行目の「ヌクレオ塩基」を「核酸塩基」と訂正する。
- xxi) 116頁2行目から117頁18行目にかけての「別の態様では、…併用実施することができる。」を「別の態様では、ターゲット核酸から特定末端をもつフラグメントを生成し、マスペクトロメトリーにより各フラグメントの質量を測定し、フラグメントを並べてより大きいターゲット核酸の配列を決定することにより、比較的大きいターゲット核酸の正確な配列決定が得られる。好ましい態様では、特定末端をもつフラグメントは特定塩

- 。
- (2) 請求の範囲
別紙の通り

(別紙)

請求の範囲

1. ターゲット核酸分子の特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントの並び方の決定方法であって、
 - a) ターゲット核酸配列と一方の末端にタグを含む核酸分子を得る段階と、
 - b) ターゲット核酸から特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントを生成する段階と、
 - c) フラグメントをマスペクトロメトリーフォーマットにより分析し、ターゲット核酸分子中の特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントの並び方を決定する段階を含む前記方法。
2. 段階b)においてヌクレアーゼをターゲット核酸と接触させ、特定塩基末端をもつ核酸フラグメントを生成する請求項1に記載の方法。
3. ヌクレアーゼがターゲット核酸中の少なくとも1個の制限部位を認識し、これを開裂することが可能な制限酵素である請求項2に記載の方法。
4. ターゲット核酸がデオキシリボ核酸であり、ヌクレアーゼがデオキシリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。
5. ターゲット核酸がリボ核酸であり、ヌクレアーゼがリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。
6. リボヌクレアーゼがG特異的T₁リボヌクレアーゼ、A特異的U₂リボヌクレアーゼ、A/U特異的PhyMリボヌクレアーゼ、U/C特異的リボヌクレアーゼA、C特異的ニワトリ肝リボヌクレアーゼ及びグリサビチンから構成される群から選択される請求項5に記載の方法。
7. 段階b)において増幅と特定塩基ターミネーション反応の併用実施により特定塩基を末端にもつフラグメントを生成する請求項1に記載の方法。
8. 増幅と特定塩基ターミネーション反応の併用が、少なくとも1種の連鎖停止

ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもち第1のポリメラーゼと、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ第2のポリメラーゼを使用して実施される請求項7に記載の方法。

9. 第1及び第2のポリメラーゼが熱安定DNAポリメラーゼである請求項8に記載の方法。

10. 熱安定DNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼ、AmpliTaq FS DNAポリメラーゼ、DeepVent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Deep Vent DNAポリメラーゼ、ThermoSequenase) exo (-) Pseudococcus furiosus (Pfu) DNAポリメラーゼ、AmpliTaq、Ultman、9 degree Nm、Tth、Hot Tub、Pyrococcus furiosus (Pfu) 及びPyrococcus woesei (Pwo) DNAポリメラーゼから構成される群から選択される請求項9に記載の方法。

11. 段階b) で生成される特定塩基を末端にもつ核酸フラグメントが質量変異ヌクレオチドを含む請求項12に記載の方法。

12. タグが3' タグを含む請求項11に記載の方法。

13. タグが5' タグを含む請求項11に記載の方法。

14. タグが非天然タグである請求項12又は13に記載の方法。

15. 非天然タグがアフィニティタグ及び質量マーカーから構成される群から選択される請求項14に記載の方法。

16. アフィニティタグが核酸の固体支持体固定化を助長する請求項15に記載の方法。

17. アフィニティタグがビオチン又は固体支持体に結合した捕獲核酸配列に結合することが可能な核酸配列である請求項16に記載の方法。

18. 生物試料中に存在するターゲット核酸の検出方法であって、

a) ターゲット核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマ

請求項23に記載の方法。

25. ホスホジエステル主鎖修飾がカチオン交換である請求項24に記載の方法。

26. プライマー又は増幅産物をアルキル化剤又は塩化トリアルキルシリルとの接触により条件付けする請求項23に記載の方法。

27. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物において脱プリン化の感度を低下する少なくとも1種のヌクレオチドを加えることにより条件付けを行う請求

項23に記載の方法。

28. ヌクレオチドがN7-デアザプリンヌクレオチド、N9-デアザプリンヌクレオチド又は2'-フルオロ-2'-デオキシヌクレオチドである請求項27に記載の方法。

29. 組織又は細胞試料中の新形成/悪性の検出方法であって、テロメラーゼをコードするか又は癌遺伝子の突然変異に特異的であるか又は腫瘍特異的遺伝子をコードする核酸をマスマスベクトロメトリーにより検出することにより試料中のテロメラーゼ活性、癌遺伝子の突然変異、腫瘍特異的遺伝子の発現を検出することを特徴とする前記方法。

30. 組織又は細胞試料中の新形成/悪性の検出方法であって、

a) 試料からテロメラーゼを単離し、合成DNAのテロメラーゼ特異的伸長を生じる条件下で、場合により固定化したテロメラーゼ反復に相補的な合成DNAプライマーと全4種のデオキシヌクレオチド三リン酸を加える段階と、

b) テロメラーゼ伸長DNA産物を増幅する段階と、

c) DNA産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、テロメラーゼ特異的伸長が検出された場合には新形成/悪性と判断する段階を含む請求項29に記載の方法。

31. プライマーが支持体に固定化するためのリンカー部分を含み、リンカー部分を固体支持体に結合することにより増幅プライマーを単離する請求項30に記載の方法。

32. 生物試料中のテロメラーゼ活性の検出方法であって、

特表2002-507883

ーを使用し、核酸又は第1組のプライマー中のプライマーを請求項92から103のいずれか一項に記載の開裂性リンカーを介して固体支持体に固定化し、生物試料から得られた核酸で第1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、増幅産物を生成する段階と、

b) 増幅産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、増幅産物が検出された場合には生物試料中にターゲット核酸が存在すると判断する段階を含む前記方法。

19. 生物試料中に存在するターゲット核酸の検出方法であって、

a) ターゲット核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマーを使用し、生物試料から得られた核酸で第1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、第1の増幅産物を生成する段階と、

b) ターゲット核酸を含む第1の増幅産物の少なくとも一部を増幅することが可能な第2組のプライマーを使用し、第1の増幅産物で第2回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、第2の増幅産物を生成する段階と、

c) 第2の増幅産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、

第2の増幅産物が検出された場合には生物試料中にターゲット核酸が存在すると判断する段階を含み、核酸又は第1組のプライマー中のプライマーもしくは第2組のプライマー中のプライマーは請求項92から103のいずれか一項に記載の開裂性リンカーを介して固体支持体に固定化する前記方法。

20. ターゲット核酸を固体支持体に固定化し、固定化したターゲット核酸をマスマスベクトロメトリーの間に支持体から開裂する請求項18又は19に記載の方法。

21. 固体支持体がビーズ、平坦表面、チップ、キャピラリー、ピン、コーム及びビューハから構成される群から選択される請求項18又は19に記載の方法。

22. マスマスベクトロメトリーの前にターゲット核酸を精製する請求項18又は19に記載の方法。

23. プライマー又は増幅産物を条件付けする請求項18又は19に記載の方法。

24. プライマー又は増幅産物をホスホジエステル主鎖修飾により条件付けする

a) 生物試料と、テロメラーゼ活性により伸長することが可能な基質プライマーと、完全な1組のデオキシヌクレオチド三リン酸をインキュベートする段階と、

b) テロメラーゼ伸長基質プライマーをマスマスベクトロメトリーにより検出し、生物試料中のテロメラーゼ活性を検出する段階を含む前記方法。

33. 基質プライマーを固体支持体に固定化する請求項32に記載の方法。

34. 基質プライマーを固体支持体にアレー状に固定化する請求項33に記載の方法。

35. テロメラーゼ伸長基質プライマーをマスマスベクトロメトリーの前に増幅する

段階を更に含む請求項32に記載の方法。

36. 突然変異癌遺伝子により形質転換した細胞又は組織の同定方法であって、

a) 1個のプライマーが固定化のためのリンカー部分を含むようにして細胞又は組織試料中で形質転換を表すコドンを含む癌遺伝子の一部を増幅する段階と、

b) 場合によりアレーの形態で固体支持体にリンカー部分を介してDNAを固定化する段階と、

c) コドンの上流の癌遺伝子配列に相補的なプライマーをハイブリダイズさせる段階と、

d) 3 dNTP/1 d dNTPとDNAポリメラーゼを加え、

ハイブリダイズしたプライマーを次のd dNTPロケーションまで伸長する段階と、

e) 試料をイオン化/揮発させる段階と、

f) 突然変異癌遺伝子を表す伸長したDNAの質量を検出し、突然変異癌遺伝子により形質転換した細胞又は組織を同定する段階を含む請求項29に記載の方法。

37. 癌遺伝子がRET癌遺伝子である請求項36に記載の方法。

38. 形質転換を表すコドンがRET癌遺伝子のコドン634である請求項37に記載の方法。

39. 腫瘍特異的遺伝子の発現の検出方法であって、

- a) ポリA RNAを試料から単離する段階と、
 b) 逆転写を使用してcDNAライブラリーを調製する段階と、
 c) 一組のプライマーのうち一方のプライマーがリンカー部分を含む1組のプライマーを使用して腫瘍特異的遺伝子のcDNA産物又はその一部を増幅する段階と
 d) リンカー部分を介してDNAを固体支持体に固定化することにより増幅産物を単離する段階と、
 e) 場合によりDNAを条件付けする段階と、
 f) 試料をイオン化/揮発させ、遺伝子の発現を表すDNAピークの存在を検出する段階を含む請求項29に記載の方法。
40. 細胞が骨髄細胞であり、遺伝子がチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子であり、遺伝子の発現が神経芽細胞腫を表す請求項39に記載の方法。
41. マトリックス助レーザーデソープション/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)マスマススペクトロメトリーを使用する2本鎖核酸の直接検出方法であって、
 a) 細胞又は組織試料から2本鎖DNAフラグメントを単離する段階と、
 b) dsDNA: ssDNA比を増加する条件として、約4℃以下の温度で分析用試料を調製することと、マトリックス中で高いDNA濃度を使用してデュプレックス形成を誘導することのうちの一方又は両方を含む条件下で分析用2本鎖DNAを調製する段階と、
 c) 低い加速電圧を使用して段階b)のDNAをイオン化/揮発させる段階と、
 d) MALDI-TOFマスマススペクトロメトリーにより2本鎖DNAの存在を検出する段階を含む前記方法。
42. 血縁関係を認識又は突然変異を検出するためのDNA試料の比較方法であって、
 a) 複数の生物試料を得る段階と、
 b) 2個以上のマイクロサテライトDNA反復配列を含む各試料からのDNA領域を増幅する段階と、
48. 伸長した核酸の質量をマスマススペクトロメトリーにより測定する請求項46に記載の方法。
49. RNA増幅を使用して生物試料中のターゲット核酸を検出する方法であって、
 a) ターゲット配列又はその相補体に相補的な配列とRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列を含むプライマーを使用してターゲット核酸を増幅する段階と、
 b) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼを使用してRNAを合成する段階と、
 c) マスマススペクトロメトリーを使用して得られたRNAを検出し、生物試料中のターゲット核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法。
50. ターゲット核酸配列の存在の検出方法であって、
 a) i) RNAポリメラーゼと、
 ii) スクレオシド三リン酸と、
 iii) ターゲット核酸配列又はその相補体とRNAポリメラーゼのプロモーターを含む核酸分子を反応混合物中でインキュベートし、ターゲット核酸配列又はその相補体を含むRNA分子を生成する段階と、
 b) マスマススペクトロメトリーによりRNA分子を検出し、ターゲット核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法。
51. ターゲット核酸配列を含む核酸分子がDNAであり、RNAポリメラーゼがDNA依存性RNAポリメラーゼである請求項50に記載の方法。
52. 段階a)の後で段階b)の前に、RNAポリメラーゼを不活化する段階と、RNアーゼフリーのDNアーゼIを使用してDNAを消化する段階を更に含む請求項51に記載の方法。
53. ターゲット核酸配列の一部に相補的なデテクターオリゴヌクレオチドを、ターゲット核酸配列を含むRNA分子にハイブリダイズさせる段階と、ハイブリダイズしなかったデテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階を更に

- c) 増幅したDNAの存在をマスマススペクトロメトリーにより各試料から検出し、増幅したDNAの分子量を比較し、分子量が異なる場合には試料間に不一致又は突然変異が存在すると判断する段階を含む前記方法。
43. 不一致が1個の試料中のDNAにおける突然変異の存在、試料を採取した個体間の非血縁関係又はHLA不適合性を表す請求項42に記載の方法。
44. 複数のマーカーを同時に試験する請求項42又は43に記載の方法。
45. 核酸配列中のターゲットヌクレオチドの同定方法であって、
 a) (i) ターゲットヌクレオチドのすぐ下流の核酸配列の一部に一致し、その一部に、特有の制限エンドヌクレアーゼ部位をコードする配列が続く5'末端と、自己相補的な3'末端をもつ第1のプライマーと、
 (ii) リンカー部分を含む第2の下流プライマーを使用してターゲットヌクレオチドを含む核酸配列の少なくとも一部を増幅し、ターゲットヌクレオチドを含む核酸配列の少なくとも一部を含む増幅2本鎖核酸を生成する段階と、
 b) リンカー部分を介して増幅2本鎖核酸を固体支持体に固定化する段階と、
 c) 固定化核酸を変性させ、非固定化鎖を単離する段階と、
 d) 3'末端をポリメラーゼにより伸長できるように、単離した非固定化鎖の3'末端の内部相補的(intracomplementary)配列をアニールし、自己アニールした核酸を生成する段階と、
 f) ポリメラーゼと3dNTPと欠損dNTPに対応する1ddNTPと共にインキュベートすることにより、自己アニールした核酸を伸長し、伸長核酸を生成する段階と、
 g) 伸長した核酸を前記特有の制限エンドヌクレアーゼ部位に特異的な制限エンドヌクレアーゼで開裂する段階と、
 h) ターゲットヌクレオチドを同定する段階を含む前記方法。
46. ターゲットヌクレオチドの同定が核酸配列中の突然変異を表す請求項45に記載の方法。
47. 伸長した核酸の質量に基づいてターゲットヌクレオチドを同定する請求項45に記載の方法。

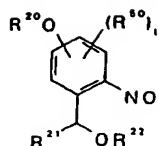
- 含み、
 段階b)において、ハイブリダイズしたデテクターオリゴヌクレオチドを検出することによりターゲット核酸配列を含むRNA分子を検出する請求項50に記載の方法。
54. ターゲット核酸配列の存在の検出方法であって、
 a) ターゲット配列又はその相補体の少なくとも一部に相補的な配列とRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列を含むプライマーを使用してターゲット核酸配列を増幅し、ターゲット核酸又はその相補体とRNAポリメラーゼプロモーターを含む増幅核酸分子を生成する段階と、
 b) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼ及びヌクレオシド三リン酸と共に増幅核酸分子をインキュベートし、ターゲット核酸配列に対応するRNAを生成する段階と、
 c) マスマススペクトロメトリーを使用してRNAを検出し、ターゲット核酸配列の

- 存在を検出する段階を含む前記方法。
55. 生物試料中に存在するターゲット核酸配列の検出方法であって、
 a) 生物試料からターゲット核酸配列を含む核酸分子を得る段階と、
 b) マスマススペクトロメトリーを使用して検出するに十分な密度でターゲット核酸配列が存在するように、チオール結合を介してターゲット核酸配列を固体支持体に固定化する段階と、
 c) デテクターオリゴヌクレオチドをターゲット核酸配列とハイブリダイズさせる段階と、
 d) ハイブリダイズしなかったデテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階と、
 e) 段階c)の産物をイオン化及び揮発させる段階と、
 f) デテクターオリゴヌクレオチドをマスマススペクトロメトリーにより検出し、デテクターオリゴヌクレオチドが検出される場合には生物試料中にターゲット核酸配列が存在すると判断する段階を含む前記方法。
56. ターゲット核酸配列を固定化前に増幅する請求項55に記載の方法。

57. デテクターオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド配列の少なくとも一方を条件付けておく請求項55又は56に記載の方法。
58. 固体支持体がビーズ、平坦表面、ピン及びコームから構成される群から選択される請求項55から57のいずれか一項に記載の方法。
59. ターゲット核酸をアレーの形態で固定化する請求項55から58のいずれか一項に記載の方法。
60. 支持体がシリコンウェハである請求項55から59のいずれか一項に記載の方法。
61. クローニング、転写、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応及び鎖置換増幅から構成される群から選択される増幅法によりターゲット核酸配列を増幅する請求項55から60のいずれか一項に記載の方法。
62. マススペクトロメーターがマトリックス助剤レーザーデソープション/イオン化飛行時間、エレクトロスプレー、イオンサイクロトロン共鳴及びフーリエ変換から構成される群から選択される請求項55から61のいずれか一項に記載の方法。
63. 少なくとも2種のデテクターオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド検出体に質量差をつけ、少なくとも2種のターゲット核酸配列を同時に検出及び区別することにより試料を条件付けする請求項55から62のいずれか一項に記載の方法。
64. 少なくとも2種のオリゴヌクレオチドの長さ又は配列の相違により質量差をつける請求項63に記載の方法。
65. デテクターオリゴヌクレオチドの塩基、糖又はリン酸部分に質量改変官能基を導入することにより質量差をつける請求項64に記載の方法。
66. ホスホジエステル結合におけるカチオン交換により質量差をつける請求項63に記載の方法。
67. マススペクトロメーター検出前に質量改変ジデオキシヌクレオシド三リン酸とDNA依存性DNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をDNAに増幅する請求項55から66のいずれか一項に記載の方法。
74. 共有結合がN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノペンゾエートを介して行われる請求項71から73のいずれか一項に記載の方法。
75. 核酸が2'-デオキシリボ核酸(DNA)である請求項71又は72に記載の方法。
76. 核酸がリボ核酸(RNA)である請求項71又は72に記載の方法。
77. エキソヌクレアーゼがヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、Ba1-31ヌクレアーゼ、大腸菌エキソヌクレアーゼI、大腸菌エキソヌクレアーゼVII、マングベীনヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼ1のエキソヌクレアーゼ活性、DNAポリメラーゼ1のK1 exon フラグメントのエキソヌクレアーゼ活性、T4 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、T7 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、Taq DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、DEEP VENT DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、大腸菌エキソヌクレアーゼI、λエキソヌクレアーゼ及びVENTa DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性から構成される群から選択される請求項71から76のいずれか一項に記載の方法。
78. 核酸が質量改変ヌクレオチドを含む請求項71から77のいずれか一項に記載の方法。
79. 質量改変ヌクレオチドがエキソヌクレアーゼ活性の程度を変更する請求項78に記載の方法。
80. 逐次遊離されるヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ遊離後、マススペクトロメーター同定前に質量改変する請求項78に記載の方法。
81. 逐次遊離されるヌクレオチドをアルカリホスファターゼと接触させて質量改変する請求項80に記載の方法。
82. マススペクトロメーターフォーマットがマトリックス助剤レーザーデソープションマススペクトロメーター又はエレクトロスプレーマススペクトロメーターである請求項71から81のいずれか一項に記載の方法。
83. a) 支持体の表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランの溶液と反応

68. マススペクトロメーター検出前に質量改変リボヌクレオシド三リン酸とDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をRNAに増幅する請求項55から67のいずれか一項に記載の方法。
69. ターゲット核酸配列が遺伝病、染色体異常、遺伝素因、ウイルス感染、真菌感染及び細菌感染から構成される群から選択される疾患又は症状を表す請求項55から68のいずれか一項に記載の方法。
70. デテクターオリゴヌクレオチドがペプチド核酸である請求項50から69のいずれか一項に記載の方法。
71. 核酸の配列の決定方法であって、
- a) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、
 - b) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、個々のヌクレオチドを逐次遊離させる段階と、
 - c) 逐次遊離したヌクレオチドの各々をマススペクトロメーターにより同定する段階と、
 - d) 同定したヌクレオチドから核酸の配列を決定する段階を含み、請求項92から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法。
72. 核酸の配列の決定方法であって、
- a) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、
 - b) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、複数の組の入れ子核酸フラグメントを生成する段階と、
 - c) 核酸フラグメントの組の各々の分子量をマススペクトロメーターにより測定する段階と、
 - d) 核酸フラグメントの組の分子量から核酸の配列を決定する段階を含み、請求項92から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法。
73. 核酸を少なくとも20 fmol/mm²の密度で支持体の表面に共有結合させる請求項71又は72に記載の方法。

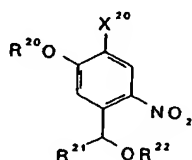
- させ、支持体の表面に第1級アミンの均質層を生成する段階と、
- b) 第1級アミンの均質層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノペンゾエートの溶液と反応させることにより支持体の表面にヨードアセトアミド官能基を付ける段階を含む方法により固定化を実施する請求項71から82のいずれか一項に記載の方法。
84. 配列番号32~38、41~86、89、92、95、98、101~110、112~123、126、128及び129に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。
85. 配列番号1~22、24及び27~32に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。
86. 標識されておらず、場合により、好ましくは5'末端に付けた質量改変部分を含む請求項84又は85に記載のプライマー。
87. 選択的に開裂可能なリンカーを介して核酸を固体支持体に固定化する請求項1から17及び26から69のいずれか一項に記載の方法。
88. リンカーが熱開裂性、酵素開裂性、光開裂性又は化学開裂性である請求項87に記載の方法。
89. リンカーがトリチルリンカーである請求項87に記載の方法。
90. リンカーが1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)-1-オ-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンと1-(4-(3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-オ-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンから構成される群から選択される請求項89に記載の方法。
91. プライマーがペプチド核酸である請求項1から90のいずれか一項に記載の方法。
92. 式1:



(II)

【式中、R²⁰はω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキル及びω-ヒドロキシアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコシカルボニル、アリールオシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び（ジアルキルアミノ）（ω-シアノアルコキシ）P-から構成される群から選択され、tは0～3であり、R¹⁰はアルキル、アルコキシ、アリール及びアリールオキシから構成される群から選択される】の化合物を含む光感受性リンカー。

93. リンカーが式I I：



(III)

【式中、R²⁰はω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキル、ω-ヒドロキシアルキル及びアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコシカルボニル、アリールオシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び（ジアルキルアミノ）（ω-シアノアルコキシ）P-から構成される群から選択され、X²⁰は水素、アルキル又はOR²⁰から構成される群から選択される】で表される請求項92に記載の光開裂性リンカー。

94. R²⁰が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピル、3-ヒド

97に記載の光開裂性リンカー。

99. R²³が水素及び（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-から構成される群から選択され、R²⁴が3-ヒドロキシプロポキシ、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシ、4-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシ-1-プロピル、1-ヒドロキシ-2-プロピル、3-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル、2-ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、4-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）ブチル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-1-プロピル、2-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）エチル、1-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-プロピル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-メチル-1-プロピル及び4，4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項97に記載の光開裂性リンカー。

100. rとsが両方とも0である請求項99に記載の光開裂性リンカー。

101. R²³が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-であり、R²⁴が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシ、4-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）ブチル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピル、2-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）エチル、1-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-プロピル、3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）-2-メチル-1-プロピル及び4，4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項100に記載の光開裂性リンカー。

102. R²⁴が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシである請求項101に記載の光開裂性リンカー。

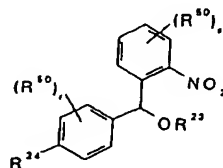
103. リンカーが1-（2-ニトロ-5-（3-0-4，4'-ジメトキシトリチルプロポキシ）フェニル）-1-0-（（2-シアノエトキシ）ジイソプロピルアミノホスフィノ）エタンと1-（4-（3-0-4，4'-ジメトキシトリチルプロポキシ）-3-メトキシ-6-ニトロフェニル）-1-0-（（2-シアノエトキシ）ジイソプロピルアミノホスフィノ）エタンから構成される群か

ロキシプロピル及びメチルから構成される群から選択され、R²¹が水素、メチル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²が水素及び（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-から構成される群から選択され、X²⁰が水素、メチル又はOR²⁰から構成される群から選択される請求項93に記載の光開裂性リンカー。

95. R²⁰が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピルであり、R²¹がメチルであり、R²²が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-であり、X²⁰が水素である請求項93に記載の光開裂性リンカー。

96. R²⁰がメチルであり、R²¹がメチルであり、R²²が（ジイソプロピルアミノ）（2-シアノエトキシ）P-であり、X²⁰が3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロポキシである請求項93に記載の光開裂性リンカー。

97. 式I I I：



(III)

【式中、R²³は水素及び（ジアルキルアミノ）（ω-シアノアルコキシ）P-から構成される群から選択され、R²⁴はω-ヒドロキシアルコキシ、ω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルコキシ、ω-ヒドロキシアルキル及びω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキルから構成される群から選択され、アルキル又はアルコキシ鎖上で1個以上のアルキル基により置換されているものであってもよく、r及びsは各々独立して0～4であり、R¹⁰はアルキル、アルコキシ、アリール又はアリールオキシである】の化合物を含む光開裂性リンカー。

98. R²⁴がω-ヒドロキシアルキル又はω-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）アルキルであり、アルキル鎖上でメチル基により置換されている請求項

ら選択される請求項102に記載の光開裂性リンカー。

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-コ-ト (参考) |
|----------------------------|---|---------------|--------------|
| G 0 1 N 33/15 | | G 0 1 N 33/50 | P |
| 33/50 | | | Z |
| | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| (31) 優先権主張番号 | 0 8 / 7 4 6 , 0 3 6 | | |
| (32) 優先日 | 平成 8 年 11 月 6 日 (1996. 11. 6) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0 8 / 7 4 6 , 0 5 5 | | |
| (32) 優先日 | 平成 8 年 11 月 6 日 (1996. 11. 6) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0 8 / 7 8 6 , 9 8 8 | | |
| (32) 優先日 | 平成 9 年 1 月 23 日 (1997. 1. 23) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0 8 / 7 8 7 , 6 3 9 | | |
| (32) 優先日 | 平成 9 年 1 月 23 日 (1997. 1. 23) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0 8 / 9 3 3 , 7 9 2 | | |
| (32) 優先日 | 平成 9 年 9 月 19 日 (1997. 9. 19) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 0 8 / 9 4 7 , 8 0 1 | | |
| (32) 優先日 | 平成 9 年 10 月 8 日 (1997. 10. 8) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (U S) | | |
| (81) 指定国 | E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, K E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, G H, H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U S, U Z, V N, Y U, Z W | | |
| (72) 発明者 | ブラウン、アンドレアス アメリカ合衆国、カリフォルニア・92030、 サン・ディエゴ、カーメル・クリーク・ロ ード・11237-6 | | |
| (72) 発明者 | ラフ、デイビッド・エム イギリス国、ベリツクシャー・ティー・デ イー・14・55・エイ、アイマス、ディー ン・ヘッド・ロード・32 | | |

- (72)発明者 シヤン、コービン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92121、
サン・ディエゴ、アンドロメダ・ロード・
8655
- (72)発明者 ファン・デン・ボーム、デイルク
ドイツ国、20253・ハンブルク、エツペン
ドルフアー・ベーク・205・デー
- (72)発明者 ユリンケ、クリスチアン
ドイツ国、20255・ハンブルク、ロームベ
ルクシュトラッセ・22
- (72)発明者 ルーベルト、アンドレアス
ドイツ国、デー—35440・リンデン、ハウ
プトシュトラッセ・10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68 C07H21/00 C07F9/24 | | International Application No PCT/US 97/20444 |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| | -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 29 July 1998 | | Date of mailing of the international search report 28.08.98 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 600 nl. Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized official Osborne, H |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No.
PCT/US 97/29444

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 96 29431 A (SEQUENOM INC) 26 September 1996 | 1 |
| X | pages 25-54 | 2-7, |
| | see page 9, line 33 - page 10, line 2; | 11-18, |
| | claims 1-49; figure 9 | 82,83 |
| X | see page 15, line 34 - page 18, line 10; | 19-34, |
| | examples 5,8 | 82,83 |
| X | see example 8 | 42 |
| X | see page 16, line 4; figures 6A,8 | 47 |
| X | page 36, ln 33 | 48,49, |
| | see page 26, line 7 | 80,81 |
| X | see page 16 - page 18, line 10; figures 3-9 | 50-64, |
| | | 68-70 |
| Y | see page 21, line 21 - line 23 | 35-37 |
| Y | see example 7 | 38,39 |
| Y | see claims 1-49 | 40,41, |
| | | 43-47, |
| | | 65-67, |
| | | 71-79 |
| Y | WO 94 16101 A (KOESTER HUBERT) 21 July 1994 | 1-7, |
| | | 11-18, |
| | | 65-79, |
| | | 82,83 |
| | see the whole document | |
| Y | WO 96 32504 A (UNIV BOSTON) 17 October 1996 | 1-7, |
| | | 11-18, |
| | | 66-79, |
| | | 82,83 |
| | especially page 21, lns 12-24. | |
| | see the whole document | |
| Y | WO 95 13381 A (GERON CORP) 18 May 1995 | 35-37, |
| | | 82,83 |
| | see page 9, line 1 - line 33 | |
| | see page 29, line 34 - page 32, line 5 | |
| | see claims 1-4; example 3 | |
| Y | FENG J ET AL: "THE RNA COMPONENT OF HUMAN TELOMERASE" SCIENCE, vol. 269, no. 5228, 1 September 1995, pages 1236-1241, XP000645335 | 35-37, |
| | see page 1236, paragraph 1 - paragraph 4 | 82,83 |
| Y | SYVANEN A -C ET AL: "DETECTION OF POINT MUTATIONS BY SOLID-PHASE METHODS" HUMAN MUTATION, vol. 3, no. 3, 1 January 1994, pages 172-179, XP000600258 | 35,38, |
| | see the whole document | 39,82,83 |
| | --- | |
| | -/-- | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Application No
 PCT/US 97/20444

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | PASINI B ET AL: "RET mutations in human disease" TRENDS IN GENETICS, vol. 12, no. 4, April 1996, pages 138-144. XP002072975 see page 141, paragraph 2 - page 144 --- | 35,38, 39,82,83 |
| Y | DE 44 31 174 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 7 March 1996 see abstract and claim 1 --- | 40,41 |
| Y | NAITO H ET AL: "Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal Neuroblastoma cells by reverse transcription-polymerase chain reaction " EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 27, June 1991, pages 762-65. XP002073102 see the whole document --- | 40,41 |
| Y | GB 2 260 811 A (YORKSHIRE CANCER RESEARCH CAMP ;UNIV LEEDS (GB)) 28 April 1993 see the whole document --- | 40,41 |
| Y | WO 96 17080 A (IMP CANCER RES TECH ;SELBY PETER JOHN (GB); BURCHILL SUSAN ANN (GB) 6 June 1996 see page 3, line 1 - line 2 --- | 35,40, 41,82,83 |
| Y | NELSON R ET AL: "Time-of-flight Mass spectrometry of nucleic acids by laser ablation and ionization from a frozen aqueous matrix " RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, vol. 4, September 1990, pages 348-351, XP002072976 see abstract --- | 42,82,83 |
| Y | TANG K ET AL: "MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION OF RESTRICTION ENZYME-DIGESTED DNA" RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, vol. 8, no. 2, February 1994, pages 183-186, XP000608266 see the whole document --- | 42,82,83 |
| Y | SIEGERT C ET AL: "Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for the detection of polymerase chain reaction products containing 7-Deazapurine moieties" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 243, 1996, pages 55-65, XP002072977 see the whole document --- | 42,82,83 |
| | --- -/- | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 97/20444

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 95 15400 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 8 June 1995 see abstract and claims 1-19 --- | 43-45, 82,83 |
| Y | WO 96 18648 A (PROMEGA CORP) 11 April 1996 see claims 1,23 --- | 43-45, 82,83 |
| Y | WO 93 23563 A (CEMU BIOTEKNIK AB ; UHLEN MATHIAS (SE); PETTERSSON BERTIL (SE)) 25 November 1993 see claims 1-7; figure 1 --- | 46,82,83 |
| Y | DE 44 38 630 A (PACHMANN KATHARINA DR ; GOEHLY URSULA (DE)) 2 May 1996 see claim 1; figures 1A,1B --- | 46,82,83 |
| Y | EP 0 593 789 A (SUMITOMO METAL IND) 27 April 1994 see abstract, claims 1 and 2 --- | 46,82,83 |
| Y | WO 96 15262 A (MEDINNOVA SF ; DZIEGLEWSKA HANNA EVA (GB); BREIVIK JARLE (NO); GAUD) 23 May 1996 see page 12, paragraph 4 - page 13, paragraph 2 --- | 46,82,83 |
| Y | WO 89 06700 A (GENENTECH INC) 27 July 1989 see the whole document --- | 47,82,83 |
| Y | WO 89 03432 A (US ENERGY) 20 April 1989 see claims 1-21; figures 1,2 --- | 65,68-70 |
| Y | US 5 288 644 A (BEAVIS RONALD C ET AL) 22 February 1994 see claims 1-8 --- | 66,67 |
| X | WO 94 21822 A (KOESTER HUBERT) 29 September 1994 see claims 1-55 --- | 65-79 |
| X | US 5 430 136 A (URDEA MICHAEL S ET AL) 4 July 1995 see column 4, line 28 - column 9, line 52 --- | 84-87 |
| X | WO 95 31429 A (UNIV BOSTON) 23 November 1995 see claims 1,19 --- | 84-87 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 97/20444

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | ORDOUKHANIAN P ET AL: "Design and synthesis of a versatile photocleavable DNA building block. application to phototriggered hybridization" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 117, 1995, pages 9570-71, XP062072978 see the whole document | 84-87 |
| E | WO 97 42348 A (SEQUENOM INC) 13 November 1997 see claims 1-48 | 1,7-10 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 97/20444

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE ANNEXES

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

It should be further noted that "claims 82-83" as designated herein refer to two claims 82 and two claims 83 which were filed as follows, claims 82, 83 followed by a second claim 82 and a second claim 83)

1. Claims 1-18, partially 82-83:

A method for determining the sequence of a target nucleic acid involving the generation of base specifically terminated fragments.

2. Claims 19-34, partially 82-83:

A method for detecting a target nucleic acid present in a biological sample based on a nested polymerase chain amplification reaction.

3. Claim 35 partially (in that it relates to the detection of neoplasia/malignancies by detecting telomerase), claims 36 and 37, and partially 82-83:

An assay for the detection of neoplasia/malignancies based on telomerase specific extension of a substrate primer and a subsequent amplification of the telomerase specific extension product by PCR.

4. Claim 35 partially (in that it relates to the detection of neoplasia/malignancies by detecting mutation of a proto-oncogene), claims 38 and 39, and partially claims 82-83:

An assay for the detection of neoplasia involving mutation analysis of mutant or wild-type alleles by primer extension reaction by a Sanger type sequencing protocol.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. Claim 35 partially (in that it relates to the detection of neoplasia/malignancies by detecting expression of a tumour-specific gene in a specific tissue type), claims 40 and 41, and partially claims 82-83:

An amplification based assay for the expression of the tyrosine hydroxylase gene in bone marrow cells as indicative of a neuroblastoma.

6. Claim 42, partially claims 82-83:

A method for directly detecting double stranded nucleic acid using MALDI-TOF mass spectrometry.

7. Claims 43-45, partially claims 82-83:

A method for comparing DNA relatedness by amplification of microsatellite DNA repeat sequences.

8. Claim 46, partially claims 82-83:

A method for detecting mutations based on target amplification using a primer that introduces a unique endonuclease restriction site into amplified target and a combination of a Sanger sequencing protocol and endonuclease digestion.

9. Claim 47, partially claims 82-83:

A method for the amplification and detection of a nucleic acid based on the synthesis of RNA using a primer containing a RNA polymerase promoter sequence.

10. Claims 48, 49, 80 and 81, partially 82-83:

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Primers per se for mass spectrometry comprising a mass modifying moiety.

11. Claims 50-64, partially 68-70, partially 73-79, partially claims 82-83:

Method for detecting a target nucleic acid sequence involving hybridisation to a detector oligonucleotide.

12. Claims 65-67, partially 68-70, 71-72, partially 73-79, partially claims 82-83:

Methods for determining a nucleic acid sequence involving exonuclease digestion.

13. Claims 84-94:

Photolabile linkers per se for use in immobilisation of nucleic acids to solid supports.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/20444

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9629431 A | 26-09-1996 | US 5605798 A | 25-02-1997 |
| | | AU 5365196 A | 08-10-1996 |
| | | CA 2214359 A | 26-09-1996 |
| | | EP 0815261 A | 07-01-1998 |
| WO 9416101 A | 21-07-1994 | AU 5992994 A | 15-08-1994 |
| | | CA 2153387 A | 21-07-1994 |
| | | EP 0679196 A | 02-11-1995 |
| | | JP 8509857 T | 22-10-1996 |
| | | US 5547835 A | 20-08-1996 |
| | | US 5605798 A | 25-02-1997 |
| | | US 5691141 A | 25-11-1997 |
| WO 9632504 A | 17-10-1996 | AU 5544696 A | 30-10-1996 |
| | | EP 0830460 A | 25-03-1998 |
| WO 9513381 A | 18-05-1995 | US 5645986 A | 08-07-1997 |
| | | US 5629154 A | 13-05-1997 |
| | | AU 1178195 A | 29-05-1995 |
| | | AU 682082 B | 18-09-1997 |
| | | AU 1209095 A | 29-05-1995 |
| | | AU 1330795 A | 29-05-1995 |
| | | AU 6058298 A | 04-06-1998 |
| | | CA 2173872 A | 18-05-1995 |
| | | EP 0728207 A | 28-08-1996 |
| | | JP 9502102 T | 04-03-1997 |
| | | WO 9513382 A | 18-05-1995 |
| | | US 5648215 A | 15-07-1997 |
| | | US 5686306 A | 11-11-1997 |
| | | US 5639613 A | 17-06-1997 |
| | | US 5693474 A | 02-12-1997 |
| | | WO 9513383 A | 18-05-1995 |
| DE 4431174 A | 07-03-1996 | NONE | |
| GB 2260811 A | 28-04-1993 | NONE | |
| WO 9617080 A | 06-06-1996 | NONE | |
| WO 9515400 A | 08-06-1995 | NONE | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/US 97/20444

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|--|
| WO 9610648 A | 11-04-1996 | AU 3998195 A CA 2118048 A | 26-04-1996 31-03-1996 |
| WO 9323563 A | 25-11-1993 | AU 4068293 A CA 2135606 A EP 0641391 A JP 8500725 T | 13-12-1993 25-11-1993 08-03-1995 30-01-1996 |
| DE 4438630 A | 02-05-1996 | NONE | |
| EP 0593789 A | 27-04-1994 | JP 5308999 A WO 9323567 A | 22-11-1993 25-11-1993 |
| WO 9615262 A | 23-05-1996 | AU 3851495 A CA 2205017 A EP 0791074 A | 06-06-1996 23-05-1996 27-08-1997 |
| WO 8906700 A | 27-07-1989 | AU 3058589 A DE 68908054 T DK 463089 A EP 0359789 A JP 2006724 A JP 2503054 T NO 300782 B | 11-08-1989 10-03-1994 20-09-1989 28-03-1990 10-01-1990 27-09-1990 21-07-1997 |
| WO 8903432 A | 20-04-1989 | US 4962037 A CA 1314247 A DE 3854743 D DE 3854743 T EP 0381693 A JP 3502041 T | 09-10-1990 09-03-1993 11-01-1996 09-05-1996 16-08-1990 16-05-1991 |
| US 5288644 A | 22-02-1994 | US 5453247 A | 26-09-1995 |
| WO 9421822 A | 29-09-1994 | AU 687801 B AU 6411694 A CA 2158642 A EP 0689610 A JP 8507926 T US 5622824 A | 05-03-1998 11-10-1994 29-09-1994 03-01-1996 27-08-1996 22-04-1997 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. appl. application No.

PCT/US 97/20444

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5430136 A | 04-07-1995 | US 5258506 A | 02-11-1993 |
| | | US 5118605 A | 02-06-1992 |
| | | US 4775619 A | 04-10-1988 |
| | | CA 2088257 A | 28-01-1992 |
| | | EP 0543889 A | 02-06-1993 |
| | | JP 8311091 A | 26-11-1996 |
| | | JP 9031090 A | 04-02-1997 |
| | | JP 2552048 B | 06-11-1996 |
| | | PL 170146 B | 31-10-1996 |
| | | PT 98488 A,B | 29-05-1992 |
| | | WO 9202528 A | 20-02-1992 |
| | | US 5545730 A | 13-08-1996 |
| | | US 5578717 A | 26-11-1996 |
| | | US 5552538 A | 03-09-1996 |
| | | US 5367066 A | 22-11-1994 |
| | | AT 133714 T | 15-02-1996 |
| | | DE 3854969 D | 14-03-1996 |
| | | DE 3854969 T | 30-05-1996 |
| | | EP 0360940 A | 04-04-1990 |
| | | EP 0703296 A | 27-03-1996 |
| | | ES 2083955 T | 01-05-1996 |
| | | JP 2092300 A | 03-04-1990 |
| | | JP 2676535 B | 17-11-1997 |
| | | US 5380833 A | 10-01-1995 |
| WO 9531429 A | 23-11-1995 | US 5643722 A | 01-07-1997 |
| | | AU 2635995 A | 05-12-1995 |
| | | CA 2189848 A | 23-11-1995 |
| | | EP 0763009 A | 19-03-1997 |
| | | JP 10500409 T | 13-01-1998 |
| WO 9742348 A | 13-11-1997 | AU 3003497 A | 26-11-1997 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成14年12月17日(2002.12.17)

【公表番号】特表2002-507883(P2002-507883A)

【公表日】平成14年3月12日(2002.3.12)

【年通号数】

【出願番号】特願平10-521832

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

C07C 205/36

205/56

C07F 9/24

C12Q 1/68

G01N 33/15

33/50

【FI】

C12N 15/00 ZNA A

C07C 205/36

205/56

C07F 9/24 F

C12Q 1/68

G01N 33/15 Z

33/50 P

Z

手続補正書

(8,400円)

平成14年 6月25日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成10年特許願第521,832号

2. 補正をする者

名称 シークエノム・インコーポレーテッド

3. 代理人

住所 〒540-0001
大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル
青山特許事務所
電話 (06) 6949-1161
FAX (06) 6949-0361

氏名 井理士 (6214) 青山 謙



4. 補正により増加する請求項の数

4

5. 補正対象書類名

請求の範囲

6. 補正対象項目名

請求の範囲

7. 補正の内容

明細の通り

10. 熱安定DNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼ、AmpliTaq FS DNAポリメラーゼ、DeepVent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、Vent (exo-) DNAポリメラーゼ、Deep Vent DNAポリメラーゼ、ThermoSequenas、exo (-) Pseudococcus furiosus (Pfu) DNAポリメラーゼ、AmpliTaq, Ultman, 9 degree Nm, Tth, Hot Tub, Pyrococcus furiosus (Pfu) 及びPyrococcus woesei (Pwo) DNAポリメラーゼから構成される群から選択される請求項9に記載の方法。

11. 段階b) で生成される塩基特異的終結核酸フラグメントが質量改変ヌクレオチドを含む請求項1に記載の方法。

12. タグが3' タグを含む請求項1に記載の方法。

13. タグが5' タグを含む請求項1に記載の方法。

14. タグが非天然タグである請求項12又は13に記載の方法。

15. 非天然タグがアフィニティタグ及び質量マーカーから構成される群から選択される請求項14に記載の方法。

16. アフィニティタグが固体支持体への核酸の固定化を促進する請求項15に記載の方法。

17. アフィニティタグが、ビオチン、又は固体支持体に結合した捕捉核酸配列に結合することが可能な核酸配列である請求項16に記載の方法。

18. 生体試料中に存在する標的核酸の検出方法であって、

a) 生物試料から得られた核酸において、標的核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマーを使用して第1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、それにより増幅産物を生成する段階と、この場合、核酸又は第1組のプライマー中のプライマーは請求項9から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して固体支持体に固定化し、

b) 増幅産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、増幅産物が検出された場合には生物試料中に標的核酸が存在すると判断する段階を含む前記方法。

(別紙)

請求の範囲

1. 標的核酸分子の塩基特異的終結核酸フラグメントの並びの決定方法であって、

a) 標的核酸配列と一方の末端にタグを含む核酸分子を得る段階と、

b) 標的核酸から塩基特異的終結核酸フラグメントを生成する段階と、

c) フラグメントをマスマスベクトロメトリーフォーマットにより分析し、それにより標的核酸分子中の塩基特異的終結核酸フラグメントの並びを決定する段階を含む前記方法。

2. 段階b) においてヌクレアーゼを標的核酸と接触させ、塩基特異的終結核酸フラグメントを生成する請求項1に記載の方法。

3. ヌクレアーゼが標的核酸中の少なくとも1個の制限部位を認識し、これを開裂することが可能な制限酵素である請求項2に記載の方法。

4. 標的核酸がデオキシリボ核酸であり、ヌクレアーゼがデオキシリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。

5. 標的核酸がリボ核酸であり、ヌクレアーゼがリボヌクレアーゼである請求項2に記載の方法。

6. リボヌクレアーゼがG特異的T₁リボヌクレアーゼ、A特異的U₁リボヌクレアーゼ、A/U特異的P₁リボヌクレアーゼ、U/C特異的リボヌクレアーゼA、C特異的ニトリリリボヌクレアーゼ及びクリサビチンから構成される群から選択される請求項5に記載の方法。

7. 段階b) において増幅と塩基特異的ターミネーション反応の併用実施により塩基特異的終結核酸フラグメントを生成する請求項1に記載の方法。

8. 増幅と塩基特異的ターミネーション反応の併用が、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的低い親和性をもつ第1のポリメラーゼと、少なくとも1種の連鎖停止ヌクレオチドに対して比較的高い親和性をもつ第2のポリメラーゼを使用して実施される請求項7に記載の方法。

9. 第1及び第2のポリメラーゼが熱安定DNAポリメラーゼである請求項8に記載の方法。

19. 生物試料中に存在する標的核酸の検出方法であって、

a) 生物試料から得られた核酸において、標的核酸を含む核酸の一部を増幅することが可能な第1組のプライマーを用いて第1回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、それにより第1の増幅産物を生成する段階と、

b) 標的核酸を含む第1の増幅産物の少なくとも一部を増幅することが可能な第2組のプライマーを使用し、第1の増幅産物において第2回目のポリメラーゼ連鎖反応を実施し、それにより第2の増幅産物を生成する段階と、この場合、核酸又は第1組のプライマー中のプライマーもしくは第2組のプライマー中のプライマーは請求項9から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して固体支持体に固定化しており、

c) 第2の増幅産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、第2の増幅産物が検出された場合には生物試料中に標的核酸が存在すると判断する段階を含む前記方法。

20. 標的核酸を固体支持体に固定化し、固定化した標的核酸をマスマスベクトロメトリーの間に支持体から剥離する請求項18又は19に記載の方法。

21. 固体支持体がビーズ、平坦表面、チップ、キャピラリー、ピン、コーム及びクレーンから構成される群から選択される請求項18又は19に記載の方法。

22. マスマスベクトロメトリーの前に標的核酸を精製する請求項18又は19に記載の方法。

23. プライマー又は増幅産物を条件付ける請求項18又は19に記載の方法。

24. プライマー又は増幅産物をホスホジエステル主鎖修飾により条件付ける請求項23に記載の方法。

25. ホスホジエステル主鎖修飾がカチオン交換である請求項24に記載の方法。

26. プライマー又は増幅産物をアルキル化剤又は塩化トリアルキルシリルとの接触により条件付ける請求項23に記載の方法。

27. プライマー又は第1もしくは第2の増幅産物において脱プリン化の感度を低下する少なくとも1種のヌクレオチドを含めることにより条件付けを行う請求項23に記載の方法。

28. ヌクレオチドがN7-デアザプリンヌクレオチド、N9-デアザプリンヌ

クレオチド又は2'-フルオロ-2'-デオキシヌクレオチドである請求項27に記載の方法。

20. 組織又は細胞試料中の腫瘍形成/悪性腫瘍の検出方法であって、テロメラーゼをコードする核酸、癌原遺伝子の突然変異に特異的である核酸又は腫瘍特異的遺伝子をコードする核酸をマスマスベクトロメトリーにより検出することにより試料中のテロメラーゼ活性、癌原遺伝子の突然変異、腫瘍特異的遺伝子の発現を検出することを含む前記方法。

30. 組織又は細胞試料中の腫瘍形成/悪性腫瘍の検出方法であって、

a) 試料からテロメラーゼを分離し、合成DNAのテロメラーゼ特異的伸長を生じる条件下で、適合により固定化したアロマ反復に相補的な合成DNAプライマーと全4種のデオキシヌクレオチド三リン酸を加える段階と、

b) テロメラーゼ伸長DNA産物を増幅する段階と、

c) DNA産物をマスマスベクトロメトリーにより検出し、テロメラーゼ特異的伸長が検出された場合には腫瘍形成/悪性腫瘍と判断する段階を含む請求項29に記載の方法。

31. プライマーが支持体に固定化するためのリンカー部分を含み、リンカー部分を固体支持体に結合することにより増幅プライマーを単離する請求項30に記載の方法。

32. 生物試料中のテロメラーゼ活性の検出方法であって、

a) 生物試料と、テロメラーゼ活性により伸長することが可能な基質プライマーと、完全な1組のデオキシヌクレオチド三リン酸をインキュベートする段階と、

b) テロメラーゼ伸長基質プライマーをマスマスベクトロメトリーにより検出し、それにより生物試料中のテロメラーゼ活性を検出する段階を含む前記方法。

33. 基質プライマーを固体支持体に固定化する請求項32に記載の方法。

34. 基質プライマーを固体支持体にアレー状に固定化する請求項33に記載の方法。

35. テロメラーゼ伸長基質プライマーをマスマスベクトロメトリーの前に増幅する段階を更に含む請求項32に記載の方法。

36. 突然変異癌原遺伝子により形質転換した細胞又は組織の同定方法であって、

1-TOF) マスマスベクトロメトリーを使用する2本鎖核酸の直接検出方法であって、

a) 細胞又は組織試料から2本鎖DNAフラグメントを単離する段階と、

b) dsDNA:ssDNA比を増加する条件として、約4℃以下の温度で分析用試料を調製することと、マトリックス中で高いDNA濃度を使用してデニブルス形成を誘導することのうちの一方又は両方を含む条件下で分析用2本鎖DNAを調製する段階と、

c) 低い加速電圧を使用して段階b)のDNAをイオン化/揮発させる段階と、

d) MALDI-TOFマスマスベクトロメトリーにより2本鎖DNAの存在を検出する段階を含む前記方法。

42. 血縁関係を組織又は突然変異を検出するためのDNA試料の比較方法であって、

a) 複数の生物試料を得る段階と、

b) 2個以上のマイクロサテライトDNA反復配列を含む各試料からDNA領域を増幅する段階と、

c) 増幅したDNAの存在をマスマスベクトロメトリーによりを試料から検出し、増幅したDNAの分子量を比較し、分子量が異なる場合には試料間に不一致又は突然変異が存在すると判断する段階を含む前記方法。

43. 不一致が1個の試料中のDNAにおける突然変異の存在、試料を採取した個体間の非血縁関係又はHtA不適合性を表す請求項42に記載の方法。

44. 複数のマーカを同時に試験する請求項42又は43に記載の方法。

45. 核酸配列中の標的ヌクレオチドの同定方法であって、

a) (1) 第1のプライマー、

この場合、

5'末端のプライマーは、標的ヌクレオチドのすぐ下流の一部の核酸配列とその後に続く特有の制限エンドヌクレアーゼ部位をコードする配列に一致するようにシエアし、

3'末端のプライマーは、自己相補的であり、

(11) リンカー部分を含む第2の下流プライマー、

a) 1個のプライマーが固定化のためのリンカー部分を含むようにして、形質転換を表すコドンを含む癌原遺伝子の一部を細胞又は組織試料中で増幅する段階と、

b) 場合によりアレーの形態で固体支持体にリンカー部分を介してDNAを固定化する段階と、

c) コドンの上流の癌原遺伝子配列に相補的なプライマーをハイブリダイズさせる段階と、

d) 3dNTP/1ddNTPとDNAポリメラーゼを加え、ハイブリダイズしたプライマーを次のddNTPロケーションまで伸長する段階と、

e) 試料をイオン化/揮発させる段階と、

f) 突然変異癌原遺伝子を表す伸長したDNAの質量を検出し、それにより突然変異癌原遺伝子により形質転換した細胞又は組織を同定する段階を含む請求項29に記載の方法。

37. 癌原遺伝子がRET癌原遺伝子である請求項36に記載の方法。

38. 形質転換を表すコドンがRET癌原遺伝子のコドン634である請求項37に記載の方法。

39. 腫瘍特異的遺伝子の発現の検出方法であって、

a) ボリA RNAを試料から単離する段階と、

b) 逆転写を使用してcDNAライブラリーを調製する段階と、

c) 1組のプライマーのうち一方のプライマーがリンカー部分を含む当該1組のプライマーを使用して腫瘍特異的遺伝子のcDNA産物又はその一部を増幅する段階と

d) リンカー部分を介してDNAを固体支持体に固定化することにより増幅産物を単離する段階と、

e) 適合によりDNAを条件付けする段階と、

f) 試料をイオン化/揮発させ、遺伝子の発現を表すDNAピークが存在を検出する段階を含む請求項29に記載の方法。

40. 細胞が骨髄細胞であり、遺伝子がチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子であり、遺伝子の発現が神経芽細胞腫を表す請求項39に記載の方法。

41. マトリックス助レーザーデソープション/イオン化飛行時間(MALDI

を使用して標的ヌクレオチドを含む少なくとも一部の核酸配列を増幅し、それにより標的ヌクレオチドを含む少なくとも一部の核酸配列を含む増幅2本鎖核酸を生成する段階と、

b) リンカー部分を介して増幅2本鎖核酸を固体支持体に固定化する段階と、

c) 固定化核酸を酸性させ、非固定化鎖を単離する段階と、

d) 3'末端をポリメラーゼにより伸長できるように、単離した非固定化鎖の3'末端に内部相補的(intracomplementary)配列をアニールさせ、それにより自己アニールした核酸を生成する段階と、

f) ポリメラーゼと3dNTPと欠損(missing)dNTPに対応する1ddNTPと共にインキュベートすることにより、自己アニールした核酸を伸長し、それにより伸長核酸を生成する段階と、

g) 伸長した核酸を前記特有の制限エンドヌクレアーゼ部位に特異的な制限エンドヌクレアーゼで開裂する段階と、

h) 標的ヌクレオチドを同定する段階を含む前記方法。

46. 標的ヌクレオチドの同定が核酸配列中の突然変異を表す請求項45に記載の方法。

47. 伸長した核酸の質量に基づいて標的ヌクレオチドを同定する請求項45に記載の方法。

48. 伸長した核酸の質量をマスマスベクトロメトリーにより測定する請求項46に記載の方法。

49. RNA増幅を使用して生物試料中の標的核酸を検出する方法であって、

a) 標的配列又はその相補体に相補的な配列とRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列を含むプライマーを使用して標的核酸を増幅する段階と、

b) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼを使用してRNAを合成する段階と、

c) マスマスベクトロメトリーを使用して得られたRNAを検出し、それにより生物試料中の標的核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法。

50. 標的核酸配列の存在の検出方法であって、

a) i) RNAポリメラーゼと、

11) ヌクレオシド三リン酸と、および

i i i) 標的核酸配列又はその相補体とRNAポリメラーゼのプロモーターを含む核酸分子を反応混合物中でインキュベートし、それにより標的核酸配列又はその相補体を含むRNA分子を生成する段階と、

b) マススペクトロメトリーによりRNA分子を検出し、それにより標的核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法、

51. 標的核酸配列を含む核酸分子がDNAであり、RNAポリメラーゼがDNA依存性RNAポリメラーゼである請求項50に記載の方法、

52. 段階a)の後で段階b)の前に、

RNAポリメラーゼを不活化化する段階と、

RNAseフリーのDNAse Iを使用してDNAを消化する段階を更に含む請求項51に記載の方法、

53. 標的核酸配列の一部に相補的なディテクターオリゴヌクレオチドを、標的核酸配列を含むRNA分子にハイブリダイズさせる段階と、

ハイブリダイズしなかったディテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階を更に含む、

この場合、段階b)において、ハイブリダイズしたディテクターオリゴヌクレオチドを検出することにより標的核酸配列を含むRNA分子を検出する請求項50に記載の方法、

54. 標的核酸配列の存在の検出方法であって、

a) 標的配列又はその相補体の少なくとも一部に相補的な配列とRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列を含むプライマーを使用して標的核酸配列を増幅し、それにより標的核酸又はその相補体とRNAポリメラーゼプロモーターを含む増幅核酸分子を生成する段階と、

b) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼ及びヌクレオシド三リン酸と共に増幅核酸分子をインキュベートし、それにより標的核酸配列に対応するRNAを生成する段階と、

c) マススペクトロメトリーを使用してRNAを検出し、それにより標的核酸配列の存在を検出する段階を含む前記方法、

63. 少なくとも2種のディテクターオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド複合体に質量差をつけ、少なくとも2種の標的核酸配列を同時に検出及び区別することにより試料を条件付けする請求項55から62のいずれか一項に記載の方法、

64. 少なくとも2種のオリゴヌクレオチドの長さ又は配列の相違により質量差をつける請求項63に記載の方法、

65. ディテクターオリゴヌクレオチドの塩基、糖又はリン酸部分に質量改変官能基(mass modifying functionalities)を導入することにより質量差をつける請求項64に記載の方法、

66. ホスホジエステル結合におけるカチオン交換により質量差をつける請求項63に記載の方法、

67. マススペクトロメトリー検出前に質量改変ジデオキシヌクレオシド三リン酸とDNA依存性DNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をDNAに増幅する請求項55から66のいずれか一項に記載の方法、

68. マススペクトロメトリー検出前に質量改変リボヌクレオシド三リン酸とDNA依存性RNAポリメラーゼを使用して、生物試料から得た核酸分子をRNAに増幅する請求項55から67のいずれか一項に記載の方法、

69. 標的核酸配列が遺伝病、染色体異常、遺伝要因、ウイルス感染、真菌感染及び細菌感染から構成される群から選択される疾患又は症状を表す請求項55から68のいずれか一項に記載の方法、

70. ディテクターオリゴヌクレオチドがペプチド核酸である請求項50から69のいずれか一項に記載の方法、

71. 核酸の配列の決定方法であって、

a) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、

b) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、個々のヌクレオチドを逐次遊離させる段階と、

c) 逐次遊離したヌクレオチドの各々をマススペクトロメトリーにより同定する段階と、

d) 同定したヌクレオチドから核酸の配列を決定する段階を含み、請求項92か

65. 生物試料中に存在する標的核酸配列の検出方法であって、

a) 生物試料から標的核酸配列を含む核酸分子を得る段階と、

b) マススペクトロメトリーを使用して検出するに十分な密度で標的核酸配列が存在するように、チオール結合を介して標的核酸配列を固体支持体に固定化する段階と、

c) ディテクターオリゴヌクレオチドを標的核酸配列とハイブリダイズさせる段階と、

d) ハイブリダイズしなかったディテクターオリゴヌクレオチドを除去する段階と、

e) 段階c)の産物をイオン化及び揮発させる段階と、

f) ディテクターオリゴヌクレオチドをマススペクトロメトリーにより検出し、ディテクターオリゴヌクレオチドが検出される場合には生物試料中に標的核酸配列が存在すると判断する段階を含む前記方法、

56. 標的核酸配列を固定化前に増幅する請求項55に記載の方法、

57. ディテクターオリゴヌクレオチド又は標的核酸配列の少なくとも一方を条件付けしておく請求項55又は56に記載の方法、

58. 固体支持体がビーズ、平坦表面、ピン及びピコームから構成される群から選択される請求項55から57のいずれか一項に記載の方法、

59. 標的核酸をアレーの形態で固定化する請求項55から58のいずれか一項に記載の方法、

60. 支持体がシリコンウェーハである請求項55から59のいずれか一項に記載の方法、

61. クローニング、転写、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応及び鎖置換増幅から構成される群から選択される増幅法により標的核酸配列を増幅する請求項55から60のいずれか一項に記載の方法、

62. マススペクトロメーターがマトリックス助レーザーデソープション/イオン化飛行時間、エレクトロスプレー、イオンサイクロトロン共鳴及びフーリエ変換から構成される群から選択される請求項55から61のいずれか一項に記載の方法、

103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法、

72. 核酸の配列の決定方法であって、

a) 配列決定しようとする核酸の多重コピーを得る段階と、

b) 多重コピーを第1の末端から第2の末端に向かってエキソヌクレアーゼで開裂し、複数の組のネスト化核酸フラグメントを生成する段階と、

c) 核酸フラグメントの組の各々の分子量をマススペクトロメトリーにより測定する段階と、

d) 核酸フラグメントの組の分子量から核酸の配列を決定する段階を含み、請求項92から103のいずれか一項に記載の光開裂性リンカーを介して共有結合により核酸を固体支持体に固定化する前記方法、

73. 核酸を少なくとも20 fmol/mm²の密度で支持体の表面に共有結合させる請求項71又は72に記載の方法、

74. 共有結合がN-スクシニミジル(4-ヨロアセチル)アミノペンゾエートを介して行われる請求項71から73のいずれか一項に記載の方法、

75. 核酸が2'-デオキシリボ核酸(DNA)である請求項71又は72に記載の方法、

76. 核酸がリボ核酸(RNA)である請求項71又は72に記載の方法、

77. エキソヌクレアーゼがヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、Ba1-31ヌクレアーゼ、大腸菌エキソヌクレアーゼI、大腸菌エキソヌクレアーゼVII、マンガンエキソヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼ1のエキソヌクレアーゼ活性、DNAポリメラーゼ1のKlenowフラグメントのエキソヌクレアーゼ活性、T4 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、T7 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、Taq DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、DEEP VENT DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性、大腸菌エキソヌクレアーゼIII、λエキソヌクレアーゼ及びVENT DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性から構成される群から選択される請求項71から76のいずれか一項に記載の方法、

78. 核酸が質量改変ヌクレオチドを含む請求項71から77のいずれか一項に記載の方法。

79. 質量改変ヌクレオチドがエキソヌクレアーゼ活性の程度(rate)を変更する請求項78に記載の方法。

80. 逐次遊離されるヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ遊離後、マスマスベクトロメトリ同定前に質量改変する請求項78に記載の方法。

81. 逐次遊離されるヌクレオチドをアルカリホスファターゼと接触させて質量改変する請求項80に記載の方法。

82. マスマスベクトロメトリフォーマットがマトリックス介助レーザーデソープシオンマスマスベクトロメトリ又はエレクトロスプレーマスマスベクトロメトリである請求項71から81のいずれか一項に記載の方法。

83. a) サブストレートの表面を3-アミノプロピルトリメトキシシランの溶液と反応させ、サブストレートの表面に第1級アミンの均質層を生成する段階と、
b) 第1級アミンの均質層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノペンソエートの溶液と反応させることにより支持体の表面にヨードアセトアミド官能基を付ける段階を含む方法により固定化を実施する請求項71から82のいずれか一項に記載の方法。

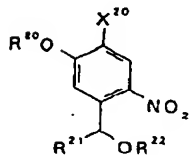
84. 配列番号32~38、41~86、89、92、95、98、101~110、112~123、126、128及び129に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。

85. 配列番号1~22、24及び27~32に記載のヌクレオチド配列の配列のいずれかの少なくとも約20、好ましくは約16個の塩基を含むプライマー。

86. 標識されておらず、場合により、好ましくは5'末端に付けた質量改変部分を含む請求項84又は85に記載のプライマー。

87. 選択的に開裂可能なリンカーを介して核酸を固体支持体に固定化する請求項1から17及び29から89のいずれか一項に記載の方法。

88. リンカーが熱開裂性、酵素開裂性、光開裂性又は化学開裂性である請求項87に記載の方法。



(II)

[式中、R²⁰はω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル、ω-ヒドロキシアルキル及びアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び(ジアルキルアミノ)(ω-シアノアルコキシ)Pから構成される群から選択され、X²⁰は水素、アルキル又はOR²⁰から構成される群から選択される]で表される請求項92に記載の開裂性リンカー。

94. R²⁰が3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル、3-ヒドロキシプロピル及びメチルから構成される群から選択され、R²¹が水素、メチル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²が水素及び(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)Pから構成される群から選択され、X²⁰が水素、メチル又はOR²⁰から構成される群から選択される請求項93に記載の開裂性リンカー。

95. R²⁰が3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルであり、R²¹がメチルであり、R²²が(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)Pであり、X²⁰が水素である請求項93に記載の開裂性リンカー。

96. R²⁰がメチルであり、R²¹がメチルであり、R²²が(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)Pであり、X²⁰が3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルである請求項93に記載の開裂性リンカー。

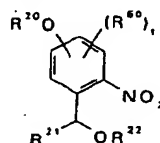
97. 式III:

89. リンカーがトリチルリンカーである請求項87に記載の方法。

90. リンカーが1-(2-ニトロ-5-(3-O-(4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)フェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンと1-(4-(3-O-(4, 4'-ジメトキシトリチルプロボキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンから構成される群から選択される請求項89に記載の方法。

91. プライマーがペプチド核酸である請求項1から83および87から90のいずれか一項に記載の方法。

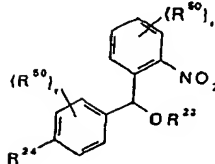
92. 式I:



(I)

[式中、R²⁰はω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル及びω-ヒドロキシアルキルから構成される群から選択され、R²¹は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル及びカルボキシから構成される群から選択され、R²²は水素及び(ジアルキルアミノ)(ω-シアノアルコキシ)Pから構成される群から選択され、rは0~3であり、R²⁰はアルキル、アルコキシ、アリール及びアリールオキシから構成される群から選択される]の化合物を含む光感受性リンカー。

93. リンカーが式II:



(III)

[式中、R²⁰は水素及び(ジアルキルアミノ)(ω-シアノアルコキシ)Pから構成される群から選択され、R²¹はω-ヒドロキシアルコキシ、ω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルコキシ、ω-ヒドロキシアルキル及びω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルから構成される群から選択され、アルキル又はアルコキシ環上で1個以上のアルキル基により置換されているとしてもよく、r及びsは各々独立して0~4であり、R²⁰はアルキル、アルコキシ、アリール又はアリールオキシである]の化合物を含む光開裂性リンカー。

98. R²⁰がω-ヒドロキシアルキル又はω-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルであり、アルキル環上でメチル基により置換されている請求項97に記載の開裂性リンカー。

99. R²⁰が水素及び(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)Pから構成される群から選択され、R²¹が3-ヒドロキシプロボキシ、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロボキシ、4-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシ-1-プロピル、1-ヒドロキシ-2-プロピル、3-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル、2-ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、4-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ブチル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-1-プロピル、2-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)エチル、1-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-プロピル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項87に記載の開裂性リンカー。

100. rとsが両方とも0である請求項99に記載の光開裂性リンカー。

101. R^{2a}が(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)Pであり、R^{2a}が3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシ、4-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ブチル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル、2-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)エチル、1-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-プロピル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから構成される群から選択される請求項100に記載の光開裂性リンカー。

102. R^{2a}が3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシである請求項101に記載の光開裂性リンカー。

103. リンカーが1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンと1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンから構成される群から選択される請求項102に記載の光開裂性リンカー。

104. ペプチド核酸である請求項84から88に記載のプライマー。

105. 標的核酸を検出する方法であって、

請求項92から103のいずれか一項に記載のリンカーを介して固体支持体に標的核酸を固定化すること；および

マスマスペクトロメトリーにより、分子量で検出される標的である固定化核酸を分析すること、

を含む前記方法。

106. 標的核酸を検出する方法であって、

請求項92から103のいずれか一項に記載のリンカーを介して固体支持体に遊離する標的捕捉配列への結合を通して固体支持体に標的核酸を固定化すること；

および

マスマスペクトロメトリーにより、分子量で検出される標的である固定化核酸を分

析すること、

を含む前記方法。

107. 核酸の配列を決定する方法であって、

請求項92から103のいずれか一項に記載のリンカーを介して固体支持体に核酸分子を固定化すること；および

核酸をエキソヌクレアーゼと接触させること；および

1つまたはそれ以上の固定化核酸分子および遊離ヌクレオチドの質量をマスマスペクトロメトリーにより決定し、それにより、各ヌクレオチドの同一性を決定し、核酸の配列を決定すること、

を含む前記方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.